

Miriam
Angélica
Cordero Burgos

Evaluación de la capacidad antagonista de aislados de *Pseudomonas* spp. en el crecimiento micelial y en la producción de esclerocios en *Sclerotium rolfsii* *in vitro* y su potencial efecto bioprotector contra el tizón del sur en jitomate *Solanum lycopersicum* L.

2024



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Evaluación de la capacidad antagonista de
aislados de *Pseudomonas* spp. en el crecimiento
micelial y en la producción de esclerocios en
Sclerotium rolfsii *in vitro* y su potencial efecto
bioprotector contra el tizón del sur en jitomate
Solanum lycopersicum L.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

Lic. en Microbiología Miriam Angélica Cordero Burgos

Dirigido por:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Co-dirigido por:

Dra. Laura Valdés Santiago

Santiago de Querétaro, Qro..

Octubre, 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Evaluación de la capacidad antagonica de aislados de *Pseudomonas* spp. en el crecimiento micelial y en la producción de esclerocios en *Sclerotium rolfsii in vitro* y su potencial efecto bioprotector contra el tizón del sur en jitomate *Solanum lycopersicum* L.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:

Lic. en Microbiología Miriam Angélica Cordero Burgos

Dirigido por:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Co-dirigido por:

Dra. Laura Valdés Santiago

Sinodales

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Presidente

Dra. Laura Valdés Santiago

Secretario

Dr. Fidel Landeros Jaime

Vocal

Dr. Humberto Ramírez Medina

Suplente

M. en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández

Suplente

Resumen

Sclerotium rolfsii es un hongo fitopatógeno que infecta una amplia variedad de cultivos de importancia agrícola, entre ellos, el jitomate. *Sclerotium rolfsii* es el agente causal del “tizón sureño”, enfermedad que ocasiona una podredumbre blanda que rodea el tallo y se extiende hasta la raíz. Causa grandes pérdidas en el cultivo de jitomate, donde México es uno de los principales productores a escala mundial. La característica principal de *S. rolfsii* es la producción de esclerocios, que son estructuras de resistencia que le permiten diseminarse además de protegerlo de condiciones climáticas adversas. Una de las alternativas para el manejo sostenible de este hongo, es la aplicación de agentes de control biológico que inhiban su crecimiento, así como la producción de esclerocios. Este mecanismo de control puede estar dado por la acción de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, que además de controlar los aspectos mencionados del hongo, promuevan el crecimiento y bienestar de la planta. Estas bacterias pueden ser aplicadas de manera individual o en conjunto formando comunidades sintéticas conocidas como consorcios.

El proyecto de tesis consistió en la identificación bioquímica y molecular de aislados de *Pseudomonas* spp. Se investigó la capacidad antagónica de consorcios formados por los aislados bacterianos para inhibir, la germinación, el crecimiento micelial, así como la producción de los esclerocios de *S. rolfsii*, así mismo, se analizó su capacidad para bio-proteger plantas de jitomate.

Las bacterias utilizadas producen distintos metabolitos con actividad antifúngica así como promotores del crecimiento vegetal. Se diseñaron cuatro consorcios: CS1, CS2, CS3 y CS4. Se determinó el efecto antagónico de los consorcios contra dos cepas de *S. rolfsii*, AHE y HAA, se encontró que los consorcios inhiben el crecimiento micelial para ambas cepas, además inhiben la producción de esclerocios al comparar con el control. Respecto a la eficacia de biocontrol de los consorcios seleccionados sobre *S. rolfsii* (AHE y HAA) en planta de jitomate, se encontró que, CS3 tiene (32.30 y 8 %, respectivamente) y CS4 (41.30 y 25 %, respectivamente). En cuanto al efecto de promoción del crecimiento vege-

tal, el consorcio CS4 aumentó el crecimiento aéreo y longitud de la raíz (Kruskal-Wallis, $p = 0,05$). De acuerdo con los resultados, los consorcios CS3 y CS4 tienen potencial para biocontrol de *S. rolfsii* en cultivos de jitomate. Mientras que el CS4, además de acción fungicida, presentó efecto biofertilizante, por lo que ambos podrían considerarse una alternativa para el tratamiento del tizón sureño.

Palabras clave: *Sclerotium*, consorcios bacterianos, fitopatógeno, compuestos volátiles, metabolitos antifúngicos.

Abstract

Sclerotium rolfsii is a phytopathogenic fungus that infects a wide variety of agriculturally important crops, including tomatoes. *Sclerotium rolfsii* is the causal agent of “southern blight”, a disease that causes a soft rot surrounding the stem and extending to the root. It results in significant losses for tomato crops, in which Mexico is one of the principal producers a global scale. The main characteristic of *S. rolfsii* is its production of sclerotia, resistance structures that enable the organism to spread and protect it from adverse weather conditions. One alternative for the sustainable management of this fungus is the application of biological control agents that inhibit its growth and the production of sclerotia. This control mechanism can occur through the action of plant growth-promoting bacteria, which not only manage the aforementioned aspects of the fungus, but also enhance the growth and well-being of the plant. These bacteria can be applied individually or as a group forming synthetic communities known as consortia.

The thesis project consisted of the biochemical and molecular identification of isolates of *Pseudomonas* spp. We examined their ability to antagonize consortia formed by bacterial isolates inhibiting germination, mycelial growth, and the production of *S. rolfsii* sclerotia. Additionally, we analyzed their capacity to bioprotect tomato plants.

The bacteria used produce different metabolites with antifungal activity as well as plant growth promoters. Four consortia were designed: CS1, CS2, CS3 and CS4. The antagonistic effect of the consortia against two strains of *S. rolfsii*, AHE and HAA, was determined. It was found that the consortia inhibit mycelial growth for both strains and reduce the production of sclerotia compared to the control. Regarding the biocontrol efficacy of the consortia on *S. rolfsii* in tomato plants, it was found that CS3 exhibited 32.30 % and 8 %, respectively, and CS4 showed 41.30 % and 25 %, respectively. In relation to the effect of promoting plant growth, the CS4 consortium increased aerial growth and root length ($p = 0.05$ Kruskal-Wallis test). According to the results, the CS3 and CS4 consortia have potential for biocontrol of *S. rolfsii* in tomato crops. Additionally, CS4

exhibited not only fungicidal action, but also a biofertilizer effect, making both consortia viable for treating southern blight.

Keywords: *Sclerotium*, bacterial consortia, phytopathogen, volatile compounds, anti-fungal metabolites.

Agradecimientos

Dedicado a mi familia, en especial a Renata y Fernando, su amor y cariño me hacen sentir que la vida es para disfrutarla, siempre están conmigo me apoyan y guían.

Agradezco profundamente al Dr. Antonio por su comprensión, paciencia, consejos y sobre todo por su orientación constante, tiene la habilidad de revelar lo mejor de las personas y hacer sentir que alcanzar el éxito es posible. Su entusiasmo, dedicación y esfuerzo me inspiran a ser una mejor persona.

A la Dra. Laura le agradezco mucho los consejos, paciencia y ánimos, sus palabras no solo me recomfortaron en ocasiones, sino que, además me ayudaron a tener el ímpetu para continuar e intentar ir más allá.

A mis sinodales, Mtra. Kruskaia, Dr. Fidel y Dr. Humberto por sus atinadas preguntas que me ayudaron a reflexionar y a dar lo mejor de mí.

A Arturo y a los Mtros. Salvador y Daniel por las pláticas para quitar el estrés y sobre todo por su asistencia técnica, sin ustedes no hubiera sido posible todo este trabajo.

Por último, agradezco sinceramente al CONAHCYT por la beca 823618 y a la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ por el proyecto FOPER-2023-FCN03400 y el proyecto FNB202207.

Índice general

Índice general	IX
Índice de tablas	XIII
Índice de figuras	XV
Índice de ecuaciones	XIX
1 Introducción	1
2 Antecedentes	5
2.1 Cultivo de Jitomate en México	5
2.2 Interacciones planta microorganismo	7
2.3 Hongos fitopatógenos	8
2.4 <i>Sclerotium rolfsii</i>	9
2.4.1 Taxonomía de <i>S. rolfsii</i>	10
2.4.2 Esclerocios de <i>S. rolfsii</i>	11
2.5 Tizón sureño	15
2.5.1 Ciclo del tizón sureño causado por <i>S. rolfsii</i> en el jitomate	16
2.6 Métodos de control en campo	18
2.7 Agentes de control biológico (BCA)	19
2.8 Rizobacterias Promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR)	21
2.9 <i>Pseudomonas</i> como BCA y PGPR	23
2.10 Mecanismos PGPR	25

2.10.1	Solubilización de fosfatos	25
2.10.2	Secreción de polisacáridos	27
2.10.3	Producción de fitohormonas: ácido indol acético (AIA)	28
2.10.4	Compuestos volátiles: ácido cianhídrico (HCN)	29
2.10.5	Producción de pigmentos de fenazina	30
2.10.6	Producción de sideróforos	31
2.10.7	Secreción de enzimas líticas	32
2.11	Consortios microbianos	33
3	Hipótesis	35
3.1	Objetivo general	36
3.2	Objetivos específicos	37
4	Materiales y métodos	39
4.1	Organismos utilizados	39
4.2	Caracterización e identificación fenotípica de los aislados de <i>Pseudomonas</i> spp.	40
4.3	Identificación molecular	41
4.3.1	Extracción de ADN	41
4.3.2	Amplificación del gen 16S ARNr y secuenciación	42
4.4	Análisis filogenético	43
4.5	Características PGPR	44
4.5.1	Solubilización de fosfatos	44
4.5.2	Producción de exopolisacáridos	44
4.5.3	Producción de ácido indol acético (AIA)	45
4.5.4	Producción de ácido cianhídrico (HCN)	45
4.5.5	Producción de piocianina y otros pigmentos de fenazina	45
4.5.6	Producción de pioverdina	46
4.5.7	Producción de quitinasas	46

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	XI
4.5.8 Producción de amilasas	47
4.5.9 Producción de lipasas	48
4.5.10 Producción proteasas	48
4.5.11 Pruebas de compatibilidad	48
4.6 Formulación de consorcios microbianos	50
4.7 Experimentos de confrontación	51
4.7.1 Difusión de los metabolitos secundarios en el medio de cultivo: método del papel celofán	51
4.7.2 Confrontación dual con barrera	52
4.7.3 Confrontación dual sin barrera	54
4.7.4 Efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios sobre la germinación de los esclerocios en ambos ais- lados de <i>S. rolfsii</i>	54
4.8 Filtrados libres de células	56
4.9 Efecto biprotector de los consorcios en planta de jitomate	57
4.10 Promoción del crecimiento vegetal de los consorcios microbianos en planta de jitomate	59
5 Resultados y discusión	61
5.1 Características fenotípicas de los aislados de <i>Pseudomonas</i> spp.	61
5.2 Identificación de la colección de bacterias por pruebas bioquímicas	63
5.3 Identificación mediante sistemas estandarizados API 20 E y API 20 NE	70
5.4 Identificación molecular	73
5.5 Filogenia de los aislados bacterianos	76
5.6 Construcción de consorcios microbianos	84
5.6.1 Perfil promotor del crecimiento de las plantas y antagonista de los aislados bacterianos	84
5.6.2 Compatibilidad entre los aislados para conformación de consorcios	98

5.6.3	Conorcios microbianos formulados para esta investigación	100
5.7	Pruebas de antagonismo contra <i>Sclerotium rolfsii</i> : difusión de los metabolitos en el medio de cultivo	105
5.8	Pruebas de antagonismo: cultivo dual barrera física	111
5.9	Pruebas de antagonismo: cultivo dual sin barrera “confrontación”	117
5.10	Efecto de los COVs secretados por los consorcios en la germinación y producción de esclerocios de <i>S. rolfsii in vitro</i>	123
5.10.1	Análisis comparativo de los resultados de los experimentos de cultivo dual	131
5.11	Impacto en la germinación de los esclerocios de ambos aislados de <i>S. rolfsii</i> debido a los filtrados libres de células de los consorcios	133
5.12	Promoción del crecimiento de las plantas de jitomate mediante la aplicación de consorcios microbianos	144
5.13	Bioprotección en planta de jitomate contra <i>S. rolfsii</i> por medio de la aplicación de consorcios microbianos	150
6	Conclusiones	159
7	Perspectivas	163
A	Secuencias 16S ARNr de los aislados bacterianos	165
	Referencias	177

Índice de tablas

1	Escala para determinar el grado de severidad de la enfermedad	58
2	Características morfológicas de los aislados bacterianos	62
3	Características bioquímicas de los aislados	67
4	Caracterización fenotípica de los aislados de <i>Pseudomonas</i> spp.	69
5	Características fenotípicas de <i>Variovorax paradoxus</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i>	69
6	Identificación de los aislados bacterianos por medio del sistema API 20 E	71
7	Identificación de los aislados bacterianos por medio del sistema API 20 NE	72
8	Identificación molecular de los aislados bacterianos con el marcador filogenético 16S ARNr	75
9	Características promotoras del crecimiento de las plantas y antagónicas presentes en los aislados.	90
10	Producción de pigmentos en los aislados bacterianos	93
11	Actividad enzimática relativa de las bacterias	97
12	Compatibilidad entre los aislados bacterianos	99
13	Segunda prueba de compatibilidad entre los aislados bacterianos	100
14	Consortios microbianos	104
15	Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en AHE por acción de los metabolitos difusibles secretados por los consorcios microbianos	106
16	Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en HAA por acción de los metabolitos difusibles secretados por los consorcios microbianos	109

17	Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en AHE por acción de los compuestos volátiles secretados por los consorcios	112
18	Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en HAA por acción de los compuestos volátiles secretados por los consorcios microbianos	116
19	Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en AHE por acción de los metabolitos secretados por los consorcios ensayo de confrontación	118
20	Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en HAA por acción de los COVs y metabolitos difusibles de los consorcios microbianos	122
21	Porcentaje de germinación de los esclerocios del aislado AHE de <i>S. rolfsii</i> expuestos a los COVs secretados por los consorcios	125
22	Porcentaje de inhibición de la producción de esclerocios en el aislado AHE por acción de los COVs secretados por los consorcios	126
23	Porcentaje de germinación de los esclerocios del aislado HAA expuestos a los compuestos volátiles producidos por los consorcios	129
24	Porcentaje de inhibición de la producción de esclerocios en el aislado HAA por acción de los COVs secretados por los consorcios	130
25	Porcentaje de inhibición micelial e IPE en AHE debido a los FCL de los consorcios y el fungicida Captan	136
26	Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en HAA por acción de los filtrados libres de células y el fungicida	138
27	Eficacia relativa de biocontrol en <i>S. rolfsii</i> AHE	154
28	Eficacia relativa de biocontrol en <i>S. rolfsii</i> HAA.	156

Índice de figuras

1	Producción de jitomate en México, 2023	6
2	Estructura de los dos tipos de melaninas más comunes en hongos	13
3	Ciclo de infección de <i>S. rolfsii</i> en el jitomate	17
4	Interracción entre planta y PGPR	22
5	Actividad enzimática relativa	47
6	Tasa de inhibición del crecimiento radial	53
7	Morfología de los aislados bacterianos	61
8	Tinciones de Gram	63
9	Pruebas TSI (A) y KIA (B)	64
10	Pruebas bioquímicas	65
11	Prueba de motilidad	66
12	Prueba de hemólisis en los aislados bacterianos en agar sangre al 5 %.	68
13	Pruebas API 20 E	70
14	Pruebas API 20 NE	71
15	Amplificación del gen 16S ARNr de los aislados 1251 y 1252	74
16	Relaciones filogenéticas de los aislados de <i>Pseudomonas</i> spp.	77
17	Árbol filogenético de las <i>Pseudomonas lini</i>	79
18	Relaciones filogenéticas del aislado de <i>Pseudomonas mediterranea</i> 1242	80
19	Árbol filogenético del subgrupo de <i>Pseudomonas putida</i>	81
20	Reconstrucción filogenética de las secuencias 16S ARNr de <i>Variovorax paradoxus</i>	82

21	Análisis comparativo de las secuencias 16S ARNr de <i>Klebsiella oxytoca</i>	83
22	Ensayo de solubilización de fosfato inorgánico	85
23	Producción de polisacáridos extracelulares en el aislado 1240	86
24	Producción de exopolisacáridos en los aislados bacterianos	87
25	Ensayo de la producción de AIA en los aislados	88
26	Prueba de producción de HCN	91
27	Producción de pigmentos de fenazina	92
28	Producción de pioverdina	93
29	Prueba de la producción de quitinasas	94
30	Ensayo de la producción de amilasas	95
31	Producción de lipasas	97
32	Ensayo de hidrólisis de la gelatina	98
33	Prueba de compatibilidad entre los aislados bacterianos	99
34	Análisis de contribución entre las características PGPR y BCA	101
35	Análisis de correlación múltiple entre las variables cuantitativas	102
36	Análisis de correlación múltiple entre las variables cualitativas	103
37	Aislados bacterianos con mayor potencial PGPB y BCA	104
38	Experimento de confrontación en el aislado AHE	105
39	Inhibición en el crecimiento micelial en ambas cepas de <i>S. rolfsii</i> por acción de los metabolitos difusibles secretados por los consorcios	107
40	Inhibición en la producción de esclerocios en ambas cepas de <i>S. rolfsii</i> debido a los metabolitos difusibles en el medio de cultivo de los consorcios	108
41	Experimento de confrontación dual en el aislado HAA	109
42	Efecto de los COVs en la producción de esclerocios de AHE	112
43	Inhibición del crecimiento de micelio en ambas cepas de <i>S. rolfsii</i> por efecto de los COVs producidos por los consorcios	113
44	Inhibición en la producción de esclerocios en ambas cepas de <i>S. rolfsii</i> por efecto de los COVs al crecer junto a los consorcios	114

45	Efecto de los COVs en la producción de esclerocios en HAA	115
46	Prueba de confrontación por el método de cultivo dual entre los consorcios vs el aislado AHE de <i>S. rolfsii</i> .	117
47	Inhibición en el crecimiento micelial en ambas cepas de <i>S. rolfsii</i> en presencia de los consorcios	119
48	Inhibición de la producción de esclerocios en ambas cepas de <i>S. rolfsii</i> por acción de los consorcios	120
49	Prueba de confrontación entre los consorcios vs el aislado HAA de <i>S. rolfsii</i> por el método de cultivo dual.	121
50	Efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios en el desarrollo de ambos aislados de <i>S. rolfsii</i> a los 7 días de incubación a 28 °C.	123
51	Los esclerocios se recuperaron de los tubos de ensayo	124
52	Efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios en la germinación de los esclerocios del aislado AHE. Placas de PDA incubadas a temperatura ambiente por hasta 30 días. Las flechas indican los esclerocios germinados.	126
53	Efecto de los compuestos volátiles secretados por los consorcios en la germinación de los esclerocios en ambas cepas de <i>S. rolfsii</i>	127
54	Inhibición en la producción de esclerocios de los esclerocios en ambas cepas de <i>S. rolfsii</i>	128
55	Efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios en la germinación de los esclerocios del aislado HAA. Placas con PDA incubadas a temperatura ambiente hasta por 30 días.	129
56	Promedio de producción de esclerocios en los experimentos de antagonismo en ambos aislados de <i>S. rolfsii</i>	132
57	Inhibición en el crecimiento de micelio en ambos aislados de <i>S. rolfsii</i> con el fungicida comercial Captan	134

58	Efecto de los filtrados libres de células en el crecimiento micelial y producción de esclerocios en AHE	135
59	Inhibición en la producción de esclerocios en ambas cepas de <i>S. rolfsii</i> debido a los filtrados libres de células	137
60	Efecto de los filtrados libres de células en el crecimiento micelial y producción de esclerocios en HAA	138
61	Efecto de los filtrados libres de células en la germinación y producción de esclerocios en AHE	140
62	Inhibición en la producción de esclerocios en ambas cepas de <i>S. rolfsii</i> debido a los filtrados libres de células	141
63	Efecto de los filtrados libres de células en la germinación y producción de esclerocios en HAA	142
64	Crecimiento aéreo de las plantas de jitomate tratadas con los consorcios CS3 y CS4	144
65	Efecto en el crecimiento de las plantas de jitomate por la aplicación de los consorcios microbianos	145
66	Crecimiento de la raíz de las plantas de jitomate inoculadas con los consorcios	147
67	Efecto de los consorcios en el crecimiento de la raíz en el jitomate	148
68	Charolas de germinación con las plántulas de jitomate y los tratamientos	150
69	Plantas de jitomate el día de la infección con uno de los aislados de <i>S. rolfsii</i>	151
70	Ensayo de biocontrol contra el aislado de <i>S. rolfsii</i> AHE	152
71	Ensayo de biocontrol contra el aislado de <i>S. rolfsii</i> HAA	153
72	Incidencia de Tizón sureño por ambas cepas de <i>S. rolfsii</i> en plantas de jitomate tratadas con los consorcios	154
73	Severidad del Tizón sureño por ambas cepas de <i>S. rolfsii</i> en plantas de jitomate tratadas con los consorcios	155

Índice de ecuaciones

4.1 Índice de solubilización de fosfatos	44
4.2 Actividad enzimática relativa	47
4.3 Porcentaje de inhibición del crecimiento radial	52
4.4 Porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios	52
4.5 Tasa de inhibición del crecimiento micelial	53
4.6 Porcentaje de germinación de esclerocios	55
4.7 Incidencia de la enfermedad tizón del sur	58
4.8 Índice de severidad	58
4.9 Eficacia de biocontrol	58

Capítulo 1

Introducción

Existe una gran variedad de microorganismos capaces de infectar a las plantas entre ellos bacterias, hongos, virus y nematodos que provocan grandes pérdidas o daños en los cultivos agrícolas [1]. Se estima que alrededor del mundo se pierden entre el 20 a 30 % de dichos cultivos debido a las plagas y patógenos [2], de estas pérdidas alrededor del 16 % es atribuido a enfermedades microbianas de las cuales del 70 a 80 % son causadas por hongos [3]. *Sclerotium rolfsii* es un basidiomiceto saprófito, polífago, ubicuo, capaz de infectar a más de 600 especies de plantas de unas 100 familias botánicas [4-6]. Este hongo provoca marchitamiento de plántulas, pudrición de tallo y raíz [7] además del tizón del sur, en una amplia variedad de cultivos hortícolas y agrícolas [8] que incluyen el jitomate (*Solanum lycopersicum L.*), pepino (*Cucumis sativus*), berenjena (*Solanum melongena*), maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*), fríjol (*Phaseolus vulgaris L.*) y sandía (*Citrullus lanatus*), entre otros [5].

Sclerotium rolfsii es capaz de desarrollar estructuras de resistencia llamadas esclerocios. Estas estructuras son redondeadas de color blanco cuando están inmaduros y de color café oscuro en la etapa madura [5]. Gracias a estas estructuras este fitopatógeno sobrevive, en el suelo, en el invierno por varios años en materia en descomposición que eventualmente germina y ataca a la planta huésped [4, 8], los esclerocios también juegan un papel fundamental en la propagación de este hongo porque, además de dispersarse por

factores ambientales, como viento y lluvia, pueden adherirse a los zapatos, herramientas y llantas de vehículos o maquinaria.

Durante la biogénesis del esclerocio en *S. rolfsii* se distinguen tres subestados: inicio, desarrollo y maduración. En la fase de desarrollo y principalmente en la maduración se forman en la superficie del esclerocio gotas de exudado. El recubrimiento de los esclerocios maduros está constituido por una corteza pigmentada con melanina además de células necrozadas [9]. Este pigmento realiza una función crucial en la supervivencia de los esclerocios al otorgarles resistencia a condiciones climáticas adversas, además, se ha establecido que la morfogénesis del esclerocio es inducida por estrés oxidativo [9]. La melanina fúngica no solo mejora las capacidades competitivas y de supervivencia contra entornos hostiles o a la degradación microbiana también juega un papel en la patogenicidad de ciertas especies de hongos [10].

El control en campo de *S. rolfsii* es realizado con tratamientos químicos, botánicos, biológicos y físicos [5]. A nivel comercial existe una amplia variedad de fungicidas químicos que inhiben la germinación de los esclerocios o el crecimiento micelial, pero se necesitan grandes cantidades de productos y su eficacia puede variar dependiendo del cultivo e incluso de la temporada [11]. Los efectos nocivos tanto sobre el medio ambiente como en la salud del ser humano son otro de los aspectos a considerar con el uso de tratamientos, además no son específicos y por lo tanto pueden destruir todo tipo de microorganismos incluso aquellos que tienen un beneficio para la planta huésped [12]. El desarrollo de alternativas seguras y ecológicas es cada vez de mayor importancia, una de estas opciones con mayor potencial para el manejo de los hongos fitopatógenos es la aplicación de bacterias antagonistas como agentes de control biológico (BCA). Los principales mecanismos exhibidos por las BCA comprenden la competencia por nutrientes y espacio, la inhibición a través de la producción de sideróforos, enzimas hidrolíticas, compuestos volátiles, antibióticos, la inducción de resistencia y la formación de biopelículas [13].

Pseudomonas spp. es un género de bacterias Gram negativas considerado como un

agente de control biológico y una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR). Este tipo de bacterias son benéficas para las plantas y tienen el potencial de utilizarse como bioinoculantes/BCA para proteger los cultivos de patógenos transmitidos por el suelo [14]. Las PGPR reducen las enfermedades en las plantas mediante la producción de antibióticos y sideróforos e inducción de resistencia sistémica [15]. Distintas cepas de *Pseudomonas* spp. han sido estudiadas y utilizadas como agentes de biocontrol desde hace varias décadas y se ha observado que estas inhiben directamente el crecimiento de una amplia variedad de patógenos en condiciones de campo y de laboratorio [16]. La capacidad de reducción de patógenos por *Pseudomonas* spp. se debe principalmente a su habilidad para sintetizar una amplia gama de metabolitos con actividad antibiótica.

Por otro lado, la capacidad de estas bacterias para promover el crecimiento vegetal se debe a la producción de fitohormonas, fosfatasa, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa así como sideróforos [17]. Varias investigaciones sugieren que algunas cepas de *Pseudomonas* spp. son capaces de inhibir el crecimiento de *S. rolf sii* en condiciones de laboratorio, por ejemplo, en un estudio en donde evaluaron la capacidad antagonica de varias cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas de la rizosfera de plantas de jitomate y pimiento contra tres fitopatógenos incluido *S. rolf sii* encontraron que la cepa PCI2 además de mostrar actividad antagonica contra los fitopatógenos mejoró el crecimiento del sistema radicular del tomate y se mostró prometedora para controlar el marchitamiento producido por *S. rolf sii* [18].

En la actualidad una manera de hacer más eficiente la producción de un compuesto específico es el uso de los consorcios microbianos que pueden estar formados por cepas de dos o más especies [19]. Una de las ventajas que presenta el empleo de los consorcios microbianos es que estos pueden ampliar el espectro de los sustratos, además se optimizan los procesos debido a la cooperación porque se ejecutan múltiples tareas de manera simultánea lo que puede reducir la carga metabólica en las cepas [20].

Una de las principales hortalizas de gran interés económico es el jitomate (*Solanum*

lycopersicum L.), es el segundo cultivo más importante detrás de la papa (*Solanum tuberosum*) [21]. México es considerado el centro de domesticación de esta planta y es uno de los principales productores en el mundo, ocupa el lugar número 8 (SIAP, 2023) y contribuye con el 2 % de la producción mundial. Querétaro se encuentra entre los cuatro Estados que obtienen mayores rendimientos en cuanto a su cosecha, ocupa la posición número 12 de los líderes productores en el país según datos de SIAP.

El cultivo de jitomate es altamente susceptible a distintos hongos fitopatógenos entre ellos *S. rolfsii* que es capaz de devastar hectáreas completas de cultivo. Este hongo emerge del suelo para infectar la región del cuello de la planta donde se perciben lesiones en el tallo o cerca de línea del suelo. Estas heridas se desarrollan rápidamente rodeando el tallo lo que provoca un marchitamiento repentino y permanente de la planta [22]. En el estado de Jalisco la pudrición sureña ataca sobre todo en las primeras etapas de la planta llegando a causar pérdidas de hasta el 80 % de las mismas [23].

Es por ello que investigar los mecanismos antagónicos ejercidos por consorcios de *Pseudomonas* spp. para inhibir el crecimiento del hongo y la germinación de esclerocios permitirá una mejor comprensión del uso de estas bacterias con un efecto bioprotector, para el manejo sostenible de la enfermedad tizón del sur en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). El objetivo de este Trabajo es determinar la capacidad antagónica de distintos aislados de *Pseudomonas* spp. de manera individual, determinar su perfil bioquímico que las catalogue como bacterias promotoras de crecimiento vegetal, establecer consorcios microbianos que potencien su efecto y determinar su posible protección de plántulas de jitomate contra este patógeno.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Cultivo de Jitomate en México

A nivel mundial el jitomate es una de las hortalizas más cultivadas y con mayor valor económico, su producción está valorada en 88 mil millones de dólares, además es uno de los ingredientes culinarios más utilizados y una fuente importante de carotenoides como tocoferoles, β -caroteno y licopeno indispensables para una dieta saludable [24]. México es uno de los principales productores de jitomate ocupa el octavo lugar en el ranking mundial de productores y provee el 24.7 % de la demanda global, el principal importador es Estados Unidos donde México abastece con un promedio de un millón 600 mil toneladas anuales desde 2015 [25]. En 2023 los Estados con mayor producción de este cultivo fueron Sinaloa, San Luis Potosí y Michoacán (Figura 1).

Un factor limitante en el cultivo del jitomate son las enfermedades fúngicas transmitidas por el suelo, algunas de las más comunes son: la marchitez causada por *Fusarium*, (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*), podredumbre blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*), marchitez causada por *Verticillium* (*V. dahliae*), podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), el tizón temprano (*Alternaria alternata*), tizón sureño (*S. rolfsii*) y tizón tardío (*Phytophthora infestans*), entre otras [23].

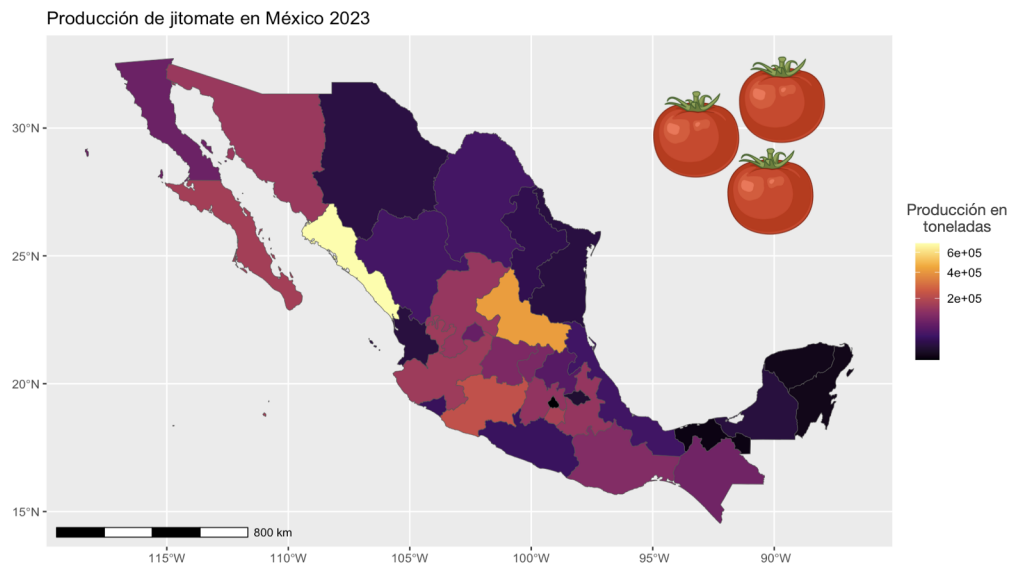


Figura 1: Producción de toneladas de jitomate en cada Estado de la República Mexicana durante el 2023. Avance de siembras y cosechas, datos abiertos, año agrícola, nacional, tomate rojo (jitomate), SIAP, 2023.

La principal estrategia para mantener la salud y el crecimiento adecuado de las plantas de jitomate es la aplicación de fertilizantes y fungicidas químicos, debido a los métodos agrícolas intensivos actuales se realiza la aplicación excesiva de estos productos químicos que genera riesgos irremediables para los ecosistemas y la salud, los fungicidas químicos persisten peligrosamente en los suelos, al no ser específicos afectan especies benéficas para el suelo amenazando la fertilidad, además la exposición o ingestión de estos productos químicos genera problemas de salud agudos a corto y mediano plazo, así como la aplicación inconsciente y repetida del mismo compuesto activo conduce al desarrollo de patógenos fúngicos resistentes [26], estas son las razones por las que las investigaciones apuntan al empleo de agentes de control biológico para el tratamiento de las enfermedades en plantas para así desarrollar prácticas agrícolas sustentables que impliquen menos riesgos en la salud pública y ambiental.

2.2 Interacciones planta microorganismo

Las plantas están rodeadas y habitadas por una gran cantidad de especies de bacterias que tienen efectos tanto benéficos y neutros, así como dañinos, se ha estimado que en un solo gramo de suelo hay más de 94 millones de microorganismos donde la mayoría de ellos son bacterias [27]. Las interacciones planta microorganismo tienen lugar en la rizosfera que es el volumen de suelo bajo la influencia de las raíces de las plantas, ésta alberga una comunidad de microorganismos diversa que interactúan y compiten entre sí y con la raíz de la planta, estas interacciones pueden influir significativamente en el crecimiento de las plantas y en el rendimiento de los cultivos y por lo tanto tienen aplicaciones biotecnológicas [28].

El conjunto de microorganismos que interactúa con la planta se denomina fitomicrobioma, recientemente se ha establecido que el microbioma de la rizosfera juega un papel importante en la reprogramación de respuesta de defensa de las plantas e incluso se ha citado como su segundo genoma ya que dicho microbioma tiene un papel muy importante tanto en la salud como en el desarrollo de las plantas, además éstos moldean dicho microbioma rizosférico mediante la secreción de exudados [29]. Diferentes factores determinan tanto la cantidad como la composición de los exudados radiculares entre ellos la especie, la edad de la planta y la presencia de factores estresantes ambientales bióticos y abióticos [30].

2.3 Hongos fitopatógenos

De las enfermedades en plantas alrededor del 70 al 80 % son causadas por hongos patógenos que reducen el rendimiento de los principales cultivos agrícolas en aproximadamente 10 % en países desarrollados y mayores al 20 % en países menos desarrollados [27]. Se estima que las pérdidas económicas debidas a las enfermedades en plantas ascienden a miles de millones de dólares anuales [31], además representan una seria amenaza a la seguridad alimentaria y afecta varios de sus componentes como la producción, la distribución, la disponibilidad, el acceso económico, la calidad e incluso el valor nutricional de los cultivos [2].

Las infecciones por fitopatógenos se presentan no solo durante el cultivo de los productos agrícolas y hortícolas sino también durante su manipulación, transporte y almacenamiento, además si el hongo patógeno produce toxinas en o sobre los productos consumibles pueden afectar la salud humana y del ganado [1]. En la actualidad las infecciones en plantas son más severas y afectan directamente la calidad y el rendimiento de los cultivos por lo que son un obstáculo en el desarrollo de una agricultura sostenible [31].

La mayoría de los hongos fitopatógenos pertenecen a los ascomicetos y basidiomicetos, los hongos patógenos necrótrofos infectan y matan el tejido vegetal para después extraer los nutrientes de las células muertas, mientras los hongos biotrófos colonizan el tejido vegetal vivo y obtienen nutrientes de las células vegetales vivas [27]. Las relaciones entre los hongos fitopatógenos son extremadamente complejas y altamente especializadas dada la larga historia evolutiva que comparten y permiten la creación de patrones de selección mutua y coevolución [31].

2.4 *Sclerotium rolfsii*

Es un hongo fitopatógeno necrotrófico que se transmite por el suelo, infecta a más de 600 especies de plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, la amplia variedad de hospederos de este hongo incluyen diversas especies de interés comercial como algodón, cacahuete, soya, jitomate, cebolla, pepino, frijol, sandía, girasol, cebolla, maíz, trigo, pimienta, manzana, narciso, lirio y crisantemo causando graves pérdidas económicas en varios cultivos [5, 10, 32, 33]. *S. rolfsii* causa la enfermedad comúnmente conocida como “Tizón o Pudrición sureña” pero también es llamada mal del esclerocio, malla blanca, marchitez de sclerotium o añublo sureño esta enfermedad ocurre principalmente en regiones cálidas, la infección se ve favorecida en suelos arenosos bien drenados y ácidos [34].

El tizón sureño es una enfermedad devastadora que se encuentra principalmente en zonas tropicales y subtropicales [26]. El crecimiento óptimo de este fitopatógeno oscila entre 25 °C a 35 °C [4]. Induce la marchitez en la planta, tizón de la corona, cancro del tallo y pudrición en la raíz, la corona, el tubérculo, el bulbo y la fruta, frecuentemente causa severas pérdidas de frutas y vegetales carnosos durante el envío y almacenamiento [35]. Cuando la infección ocurre en las hojas se observan manchas de color marrón y centro blanco primero pequeñas zonas, pero que podrán expandirse hasta causar que la hoja se necrose hasta en un 70 %, en estas lesiones también se observa abundante micelio y sobre éste la producción de esclerocios [36].

Sclerotium rolfsii infecta a las plantas en cualquier etapa del desarrollo, provoca lesiones de marrón oscuro en la base de los tallos seguida de la caída y marchitez de las hojas y el marchitamiento paulatino de toda la planta desencadenando su muerte [8]. Las plantas invadidas mueren rápidamente y aquellas que ya han desarrollado tejido leñoso no son invadidas por completo pero el hongo crece hacia la corteza las rodea y eventualmente las conduce a la muerte. Generalmente la infección comienza en el tallo con

una lesión húmeda que rápidamente se cubre con una masa algodonosa de micelio blanco que desciende hasta la raíz lo que destruye el sistema radicular, el micelio estará presente dentro y fuera de los tejidos infectados y desde estos crece sobre el suelo infectando a las plantas adyacentes [35]. En este micelio se desarrollarán los esclerocios, estructuras de resistencia que permiten a este fitopatógeno sobrevivir a condiciones adversas, los esclerocios tienen diámetros de 0.5 a 2 mm y permanecen viables en restos de plantas o en el suelo por hasta 7 años [6]. Los esclerocios comienzan a desarrollarse después de 4 a 7 días de crecimiento primero son de color blanco, pero paulatinamente se tornan color marrón oscuro, estos esclerocios contienen hifas viables que sirven como principal fuente de inóculo en el ciclo de la enfermedad [32].

Durante su patogénesis *S. rolfsii* secreta enzimas pectolíticas y ácido oxálico, estos compuestos hidrolizan la pectina, afectan las paredes celulares y alteran la respuesta de defensa de la planta [8], además el ácido oxálico fúngico promueve la actividad poligalacturonasa lo que crea un ambiente ácido en los tejidos vegetales, éstos a su vez, inactivan las proinhibinas y fitoalexinas y reducen la resistencia en las plantas [26].

Sclerotium rolfsii causa grandes pérdidas económicas en muchos cultivos por ejemplo en la menta del 5 al 20 %, en las papas causa del 25 al 90 %, y en el tomate y la alcachofa de entre un 10 y un 45 % [8], e incluso se ha estimado pérdidas de entre 10 y 20 millones de dólares en la producción de cacahuete al sur de Estados Unidos [33].

2.4.1. Taxonomía de *S. rolfsii*

El fitopatólogo italiano Pier Andrea Saccardo describió a la especie en 1911 y la colocó dentro del género *Sclerotium*, con el nombre de *S. rolfsii*. Por otra parte, Mario Curzi en 1932 descubrió el estadio sexual portador de esporas o teleomorfo y lo situó dentro del género *Corticium* [6], sin embargo, en 1978 Tu y Kimbrough reclasificaron al hongo al género *Athelia*, así el estadio anamorfo o de reproducción asexual es conocido como *Sclerotium rolfsii* mientras su teleomorfo es *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu y Kimbr. [32].

Cabe destacar que raramente encontraremos este estadio en la naturaleza. Peter Henry Rolfs en 1982 la reportó por primera vez como plaga del tomate en Florida, en donde causó pérdidas de hasta el 70 % de los cultivos.

En cuanto a la taxonomía *S. rolfsii* pertenece al filo basidiomycota en donde encontramos hongos filamentosos que se reproducen sexualmente mediante la formación de basidios que son órganos en donde se desarrollan las basidiosporas, a este filo pertenecen más de 30000 especies lo que lo convierte en el segundo filo más grande entre los hongos. El orden de los *Atheliales* pertenece a la clase *Agaricomycetes*, que es la más conocida dentro del filo, la familia *Atheliaceae* incluye 22 géneros de los cuales el género *Athelia* contiene 28 especies y la más reconocida es *Athelia rolfsii* [6].

2.4.2. Esclerocios de *S. rolfsii*

Algunos hongos filamentosos fitopatógenos exhiben una primitiva forma de diferenciación: la diferenciación esclerocial, los esclerocios son masas de micelio, cuerpos compactos de hifas, que según su desarrollo se conocen cuatro tipos principales, los terminales, los de cadena lateral, los de cadena simple y los sueltos. Ejemplos de estos tipos de esclerocios están representados por *Sclerotinia sclerotium*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia minor*, *Rhizotocnia solani*, respectivamente [37].

Los esclerocios suelen tener formas irregulares, se desarrollan a partir de ramificaciones de hifas vegetativas que se adhieren, mientras las hifas externas forman una corteza melanizada, el tejido interno se convierte en una corteza de células de paredes gruesas y una médula central [9].

La biogénesis esclerótica se ha dividido comúnmente en tres subestados con base en características macroscópicamente evidentes; el inicio del esclerocio donde se observan pequeñas formas iniciales de hifas entretejidas altamente proliferantes, el desarrollo del esclerocio en donde aumenta de tamaño y la maduración caracterizada delimitación de

la superficie, la consolidación interna, la pigmentación con melanina y la secreción de exudados [38]. Los esclerocios están compuestos por ácidos grasos, proteínas, amoníaco y enzimas como la polifenoloxidasas formadora de melanina, peroxidas y catalasas, esta composición bioquímica sugiere un origen citoplasmático que podría explicar que el estado de maduración los esclerocios tengan una corteza pigmentada con melanina que también tiene células necrosadas [9].

Se ha propuesto la teoría de que la biogénesis esclerótica es inducida por estrés oxidativo ya que este proceso está acompañado por la acumulación de productos de peroxidación lipídica que es un indicador de estrés oxidativo, algunos estudios han mostrado que ciertos antioxidantes secuestradores de radicales hidroxilos, como la vitamina C y el β -caroteno inhibieron la diferenciación esclerótica en *S. rolfsii* [37]. En *S. rolfsii* la luz además de promover la acumulación de melanina en los esclerocios a través de la inducción de tirosinasa, una de las principales enzimas en la vía de síntesis de las melaninas, provoca la biogénesis esclerótica, algunos otros factores que desencadenan la producción de esclerocios son las altas temperaturas, la limitación de nutrientes que causan estrés oxidativo [9]

Durante la fase de maduración un rasgo característico de la corteza de los esclerocios es su cambio gradual de color de blanco a beige a marrón oscuro o negro debido a la acumulación de melanina, los depósitos de melanina en la paredes de la corteza en grandes cantidades reducen la permeabilidad celular y protege al esclerocio de agentes ambientales tóxicos como las especies reactivas de oxígeno (ROS), los rayos ultravioleta y la degradación biológica por enzimas producidas por el propio hongo o por microorganismos antagonistas [38].

La melanina es un pigmento poliaromática presente en muchos organismos superiores y también en microorganismos que se genera por la polimerización oxidativa de moléculas indólicas y fenólicas (Figura 2), de color marrón oscuro a negro, pero en ocasiones también se han observado colores amarillentos y rojizos. Químicamente tiene un alto peso

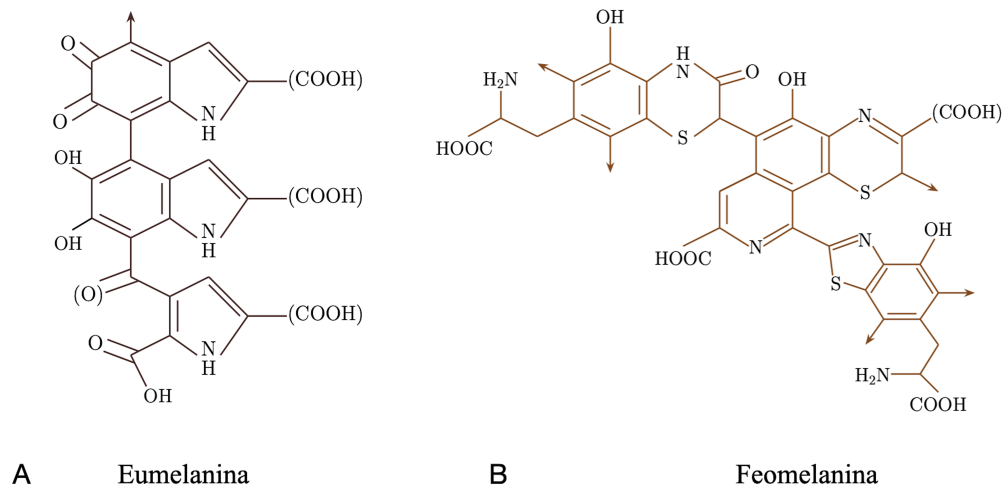


Figura 2: Estructura de los dos tipos de melaninas más comunes en hongos: eumelanina y feomelanina. Las flechas indican sitios para la conexión de otras unidades. Imagen modificada de [39]

molecular, cargada negativamente, de naturaleza hidrófoba formando polímeros complejos que resisten los ácidos concentrados, además de ser termoestables [39]. La melanina no solo protege al hongo de condiciones ambientales adversas, sino que además contribuye a la patogenicidad de ciertas especies de hongos al influir en el desarrollo de estructuras de penetración [40].

Los esclerocios que produce *S. rolfsii* no solo le permiten sobrevivir a condiciones climáticas desfavorables, sino que además representan una de sus principales fuentes de diseminación ya que se propagan fácilmente adheridos en los neumáticos de vehículos o maquinaria, en los zapatos, en herramienta, en salpicaduras de agua [33]. Los esclerocios pueden diseminarse también al ser transportados grandes distancias en frutos y verduras infectados, insectos, aves, en agua en movimiento, en trasplantes de plántulas infectadas, e incluso en algunos huéspedes se mezclan con las semillas [35].

Otro de los factores que contribuye a la propagación de este fitopatógeno es la gran cantidad de esclerocios que produce en condiciones de laboratorio se producen hasta mil esclerocios en tan solo 20 días, mientras que en la naturaleza se encuentran entre 8.6 a

21.9 esclerocios por cada 700 g de suelo [41] cada uno de ellos posee el potencial para germinar y dar lugar a una nueva infección en alguna otra planta huésped.

2.5 Tizón sureño

El rango de hospederos que puede infectar *S. rolfsii* es muy amplio abarca cereales, flores, legumbres, forrajes y la mayoría de las frutas y verduras, entre ellas el jitomate, las enfermedades que causa este fitopatógeno se presentan principalmente en regiones con climas cálidos [35]. El tizón o marchitez sureña es especialmente agresiva en la base del tallo de los tomates, cuando la infección es aguda se aprecia como necrosis de los tejidos blandos de la corteza del tallo cerca de la línea del suelo, este síntoma suele ser el primero en observarse, más tarde si las condiciones climáticas son favorables crece un micelio blanco y espeso que se apodera rápidamente de la lesión basal y es claramente visible justo debajo de la superficie del suelo este micelio se extenderá por el suelo que rodea la planta [42]; [43]. En este micelio se formarán los esclerocios, también se observa la caída progresiva, amarillamiento y marchitamiento de toda la planta, en ocasiones la planta se derrumba poco después de la infección [43]. El micelio también invade el sistema radicular de la planta provocando la pudrición total y la muerte de la planta [42].

Cuando *S. rolfsii* infecta tubérculos, bulbos y órganos carnosos produce una pudrición blanda, el fruto en contacto con el suelo exhibe una lesión amarillenta seguida de la podredumbre blanda, el micelio y los esclerocios se desarrollan en los tejidos en descomposición, en los frutos ocurre algo similar, las hojas en contacto con el suelo también pueden ser atacadas por este hongo [35];[42]. La infección en la hoja comienza con una mancha clorótica en la superficie, gradualmente se torna necrótica mide entre 5 a 10 mm de diámetro, las machas son circulares de color marrón claro y hay más de una mancha estas tienden a unirse entre sí, en los tejidos necróticos aparecen anillos concéntricos sobre los que crece micelio y se forman esclerocios [41].

2.5.1. Ciclo del tizón sureño causado por *S. rolfsii* en el jitomate

El ciclo de vida de este hongo comienza con la germinación de los esclerocios en primavera cuando las condiciones climáticas son favorables (Figura 3), cuando el micelio proveniente de los hongos entra en contacto con las plantas se produce la penetración directa mediante la producción de enzimas pectinolíticas, celulolíticas, entre otras, lo que mata y desintegra los tejidos antes de penetrar, aunque las heridas facilitan la infección [35];[6]. El crecimiento de las hifas se reanuda en la estación lluviosa provenientes de los tejidos infectados y de la germinación de los esclerocios, el micelio entra en contacto con los tejidos susceptibles como la raíz, la corona, las hojas y los frutos, las hifas son intracelulares y intercelulares [41].

En condiciones de humedad la enfermedad avanza rápidamente y el micelio puede cubrir la planta por completo, las plantas maduras infectadas se marchitan repentinamente y se tornan amarillas [6], ya que, el hongo produce una variedad de sustancias químicas como el ácido oxálico y la poligalacturonasa principales componentes de sus factores de patogénesis, la actividad poligalacturonasa es promovida por el ácido oxálico fúngico lo que proporciona un ambiente ácido en los tejidos de la planta, que inactivan las inhibidoras y fitoalexinas lo que reduce la resistencia de la planta [26].

Al poco tiempo de la muerte de la planta se forman numerosos esclerocios pequeños, redondos y blanquecinos en todos los tejidos infectados, es así como el hongo sobrevive el invierno en forma de esclerocios que se pueden propagar por medio de herramientas contaminadas, agua en movimiento, el suelo infestado, las plántulas, frutas y verduras infectadas y en algunos hospedantes mezclados con las semillas [35]. *S. rolfsii* ocasionalmente en condiciones de humedad produce basidiosporas, etapa sexual de reproducción, en las lesiones que pueden diseminarse por el aire, lo que provoca que otras plantas se enfermen lo que se conoce como ciclo secundario de infección [6], cada basidiospora genera de 1 a 3 tubos de germinación al entrar en contacto con la planta y cada uno produce

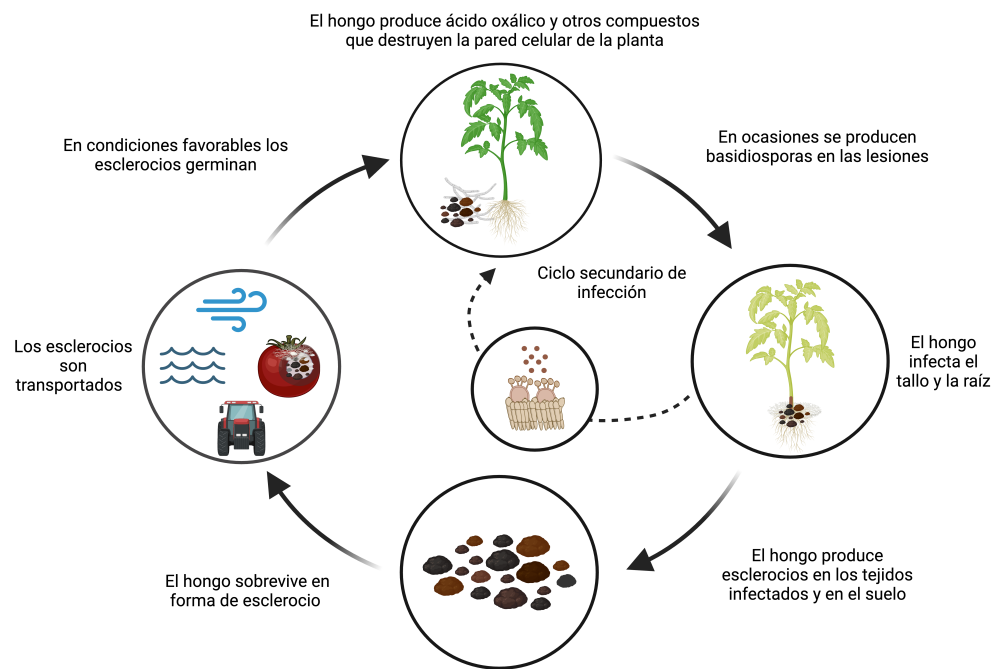


Figura 3: Ciclo de infección de *S. rolfsii* en el jitomate, creado con BioRender.com

apresorios, estructuras especializadas con las cuales el fitopatógeno penetra en la planta [41].

2.6 Métodos de control en campo

El manejo de las enfermedades causadas por *Sclerotium rolfsii* es difícil por diversas razones, incluidas la amplia gama de hospederos que dificultan la rotación de cultivos, el crecimiento prolífico del fitopatógeno, así como la capacidad para producir estructuras de sobrevivencia, es decir, los esclerocios [41]. Los métodos para el control en campo de *S. rolfsii* incluyen la solarización del suelo, el arado profundo, la fertilización con fertilizantes de amonio, la aplicación de compuestos de calcio y fungicidas como el pentacloronitrobenceno (PCNB) al suelo antes de la siembra sin embargo estos tratamientos proporcionan sólo un control parcial [35].

Algunos de los fungicidas químicos que han sido utilizados contra este hongo son benomilo, sancozeb, topsin M, dithane M-45, thiovit, carbendazim, captan [5] que tienen un éxito limitado debido a que los efectos son variables en diferentes cultivos, además de que se requieren grandes cantidades de químicos y se pueden obtener distintos resultados dependiendo de la estación del año en que se apliquen [41]. El uso de los fungicidas químicos es restringido debido a su alta toxicidad con el medio ambiente y con el ser humano, además de sus exorbitantes costos, ya que se requieren grandes cantidades por lo que resultan poco prácticos [6].

Otros tratamientos utilizados contra *S. rolfsii* comprenden la aplicación de enmiendas orgánicas, de fertilizantes y de BCA, dentro de estos últimos encontramos bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Rhizobium*, así como, hongos de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium* y *Fusarium* [5], el principal modo de acción de un agente de biocontrol es el parasitismo y la antibiosis [41]

2.7 Agentes de control biológico (BCA)

En la actualidad ha crecido el interés por alcanzar una agricultura ecológica y sostenible debido a la necesidad de cambiar paulatinamente la total dependencia de los métodos químicos de control de las enfermedades transmitidas por el suelo causadas por patógenos que habitan el suelo y completan parcial o totalmente su ciclo de vida en el entorno de la rizosfera causando enfermedades en las plantas [17]. Los BCA son considerados una alternativa o complemento adecuado que contrasta con los métodos convencionales que han surgido como opción preferida por su éxito en generar un riesgo reducido de resistencia y por su complejo modo de acción [44].

Los mecanismos de control biológico que presentan los BCA son diversos y dependen de las peculiaridades tanto del patógeno como del antagonista, así como de la densidad y especificidad de las interacciones que ocurren entre las especies. Un BCA exitoso se caracteriza por la activación de varios mecanismos y objetivos dirigidos a controlar el patógeno, así como su efecto perjudicial además no deben de producir metabolitos tóxicos para la salud humana y del medio ambiente [45].

Las bacterias que colonizan las raíces de la planta y promueven su crecimiento se conocen como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, por sus siglas en inglés), las PGPR antagonistas han desatado un gran interés dado el extraordinario potencial para reducir las enfermedades de las plantas particularmente de los géneros *Burkholderia*, *Bacillus* y *Pseudomonas* que incluso se han llegado a comercializar como bioinoculantes para mejorar el crecimiento de las plantas y controlar las enfermedades [17].

De manera general los mecanismos de biocontrol se dividen en dos grupos: los indirectos, como la inducción de resistencia sistémica, y los directos como el antagonismo, que se define como la oposición expresada activamente en donde la cepa de PGPR ejerce una acción primaria y directa contra el fitopatógeno que comprenden la antibiosis, la

competencia por el espacio y los nutrientes, la depredación y el parasitismo; de estos la antibiosis parece ser el mecanismo principal que ha sido ampliamente estudiado e incluye una amplia variedad de metabolitos [46].

2.8 Rizobacterias Promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR)

En 1978 fue definido por primera vez el término Rizobacterias Promotoras del Crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) por Kloepper y Schroth para incluir aquellas bacterias que colonizan las raíces después de la inoculación en las semillas y mejoran el crecimiento de las plantas, sin embargo, la definición fue revisada en 1989 por Kloepper como bacterias de vida libre que benefician el suelo y mejoran el crecimiento de las plantas PGPR [47]. Las PGPR (Figura 4) son un grupo de bacterias que se destacan debido a que ejercen diversos efectos benéficos que mejoran el crecimiento de la planta, por ejemplo, la fijación de N_2 , supresión de enfermedades, producción de fitohormonas, síntesis de antibióticos, aumentan la disponibilidad de fosfatos y otros nutrientes del suelo [44].

Las PGPR se pueden definir como la parte vital de la microbiota de la rizosfera que al cultivarse junto a plantas huésped estimulan el crecimiento del hospedante, estas rizobacterias tienen una versatilidad bioquímica para metabolizar diversos compuestos xenobióticos y naturales además de una tasa de crecimiento rápida y una elevada adaptabilidad a diferentes condiciones por lo que representan un componente primordial en la gestión de prácticas agrícolas sostenibles. Sin embargo, ahora el concepto de PGPR se ha limitado a bacterias que cumplan con tres criterios: colonización agresiva, estimular el crecimiento de las plantas, así como presentar mecanismos de biocontrol [43].

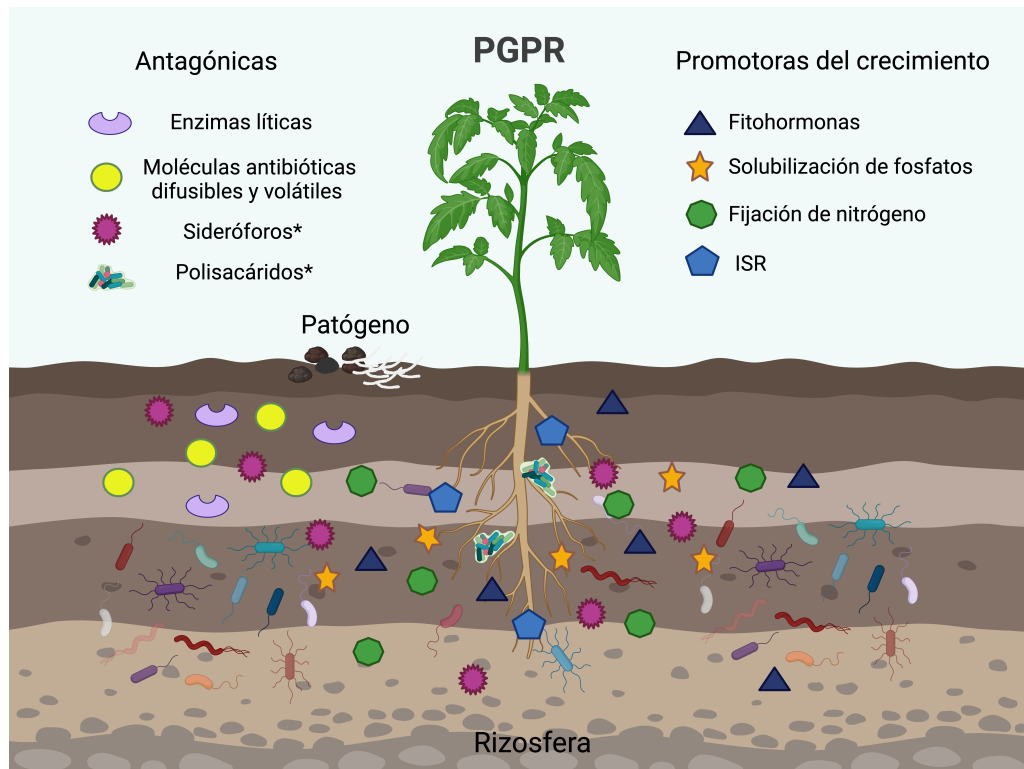


Figura 4: Interacción entre planta y PGPR. Las PGPR mantienen una comunicación directa y permanente con la planta hospedera, promueven el crecimiento de la misma mediante la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de fitohormonas, protegen a la planta al competir con los fitopatógenos por el espacio y los nutrientes, también producen enzimas líticas y un amplio espectro de moléculas antibióticas tanto difusibles como volátiles que suprimen el crecimiento de los fitopatógenos asimismo inducen la resistencia sistémica de la planta. Creado con BioRender.com

2.9 *Pseudomonas* como BCA y PGPR

El grupo de las *Pseudomonas* es una de las comunidades microbianas más importantes del suelo además de estar presentes en abundancia en todos los agroecosistemas, son altamente competentes en la rizosfera al igual que una gran diversidad metabólica que las convierte en organismos muy apropiados para el biocontrol de enfermedades en plantas [17].

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos, un gran número de especies produce exopolisacáridos conocidos como biopelículas, cepas específicas de *Pseudomonas* fluorescentes poseen un potencial para suprimir patógenos y mejorar el crecimiento de las plantas, asimismo participan en el ciclo del nitrógeno y del carbono en la naturaleza, una gran variedad de especies de *Pseudomonas* fluorescentes ha sido ampliamente estudiada por su potencial antagónico entre ellas *P. pyrocinia*, *P. chlororaphis*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida* [43]

Las *Pseudomonas* son organismos versátiles que producen una sorprendente variedad de metabolitos antimicrobianos, son competentes en la rizosfera y tienen una facilidad de formulación, constantemente se informa que sintetizan metabolitos antibióticos efectivos como 2,4-diacetilfloroglucinol, oomicina A, ácido fenazina-1-carboxílico, fenazina-1-carboxamida, piocianina, antranilato, pirrolnitrina, pioluteorina, el cianuro de hidrógeno, el amoníaco, la viscosinamida y el ácido glucónico controlan muchas enfermedades provocadas por hongos patógenos transmitidos por el suelo en diferentes cultivos de todo el mundo [17].

Varios metabolitos con actividad antibiótica que producen las *Pseudomonas* se han estudiado por su actividad de biocontrol contra una variedad de fitopatógenos, por ejemplo, una cepa de *Pseudomonas putida* NH-50 produce pioluteorina para biocontrol de la podredumbre roja causada por *Glomerella tucumanensis* en caña de azúcar. *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 produjo 2-hexil, 5-propil resorcinol para biocontrol de *Dematopho-*

ra necatrix que provoca podredumbre de la raíz en el aguacate. Otra cepa de *Pseudomonas* LBUM300 produjo HCN y DAPG contra *Clavibacter michiganensis* que causa el cancro bacteriano en tomate y otra cepa *Pseudomonas* CMR12a productora de fenazinas y lipopéptidos cíclicos fue utilizada con éxito para el biocontrol de *Rhizoctonia* spp que ocasiona la podredumbre de raíz en frijol [46].

2.10 Mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas y antagónicos

Las PGPR influyen en la absorción de nutrientes, el rendimiento y el crecimiento de las plantas, además presentan diferentes herramientas de biocontrol, los principales géneros de cepas PGPR incluyen al grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus* y algunas bacterias Gram positivas formadoras de esporas [46]. Estas bacterias pueden suprimir un amplio espectro de enfermedades bacterianas, fúngicas y las causadas por nematodos, así como brindar protección contra enfermedades virales, el uso de las PGPR se ha convertido en una práctica común en diferentes regiones del mundo debido a que han exhibido un control significativo de fitopatógenos en estudios tanto en condiciones de laboratorio como de invernadero, consistentes con los resultados en campo [48]. Las PGPR suprimen fitopatógenos y estimulan el crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos algunos se describen a continuación.

2.10.1. Solubilización de fosfatos

El fósforo P es el segundo macronutriente que más limita la producción de cultivos ya que es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero permanece fijado en el suelo y no está disponible para las plantas. El fósforo las plantas lo toman del suelo en forma de aniones fosfato que son altamente reactivos y pueden quedar atrapados mediante su precipitación con cationes dependiendo la calidad del suelo [43]. En la naturaleza el P se encuentra en forma orgánica o inorgánica muy poco soluble y menos del 5 % del contenido total de P en el suelo puede ser utilizado por las plantas [49]. Sin embargo, algunas bacterias del suelo tienen un papel importante en la solubilización del P por medio de la secreción de ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido cítrico, ácido glucónico) y enzimas (C-P liasas, fosfonatos y fosfatasas), que convierten el P en una forma soluble [50].

Las plantas solo pueden absorber P en dos formas solubles los iones monobásicos

(H_2PO_4^-) y los iones dibásicos (HPO_4^{2-}), en la actualidad se han registrado varios microorganismos solubilizadores de fosfatos que presentan diversos mecanismos para realizar esta tarea, aunque la liberación de exudados de las raíces de las plantas, como ligandos, también pueden afectar la concentración de P en el suelo, y en algunos casos la solubilización es inducida por la falta de P en el suelo [43].

El principal mecanismo de los microorganismos capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos es mediante la producción y excreción de ácidos orgánicos y H^+ en el suelo circundante, lo que resulta en la acidificación de ese suelo y la solubilización del fósforo de compuestos minerales insolubles, otro mecanismo de liberación de los fosfatos es por medio de la formación de complejos estables entre cationes, Ca_2^+ , Fe_3^+ y Al_3^+ , resultado de la quelación con los ácidos orgánicos producidos por las bacterias [49].

Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular como carbohidratos, lípidos y péptidos, estos son producidos en el periplasma de muchas bacterias Gram negativas a través de la ruta de la oxidación directa de la glucosa, los ácidos se difunden libremente hacia el exterior de la célula lo que causa la liberación de fósforo soluble a partir de fosfatos minerales, son varios los ácidos orgánicos producidos por las bacterias.

Se ha reportado al ácido glucónico como el agente de solubilización de fosfatos más frecuente, otros ácidos que solubilizan fosfatos producidos por las bacterias incluyen ácido 2-ceto glucónico, ácido láctico, isovalérico, isobutírico, acético, cítrico y oxálico, entre otros [51]. Los géneros bacterianos considerados como solubilizadores de fosfatos más importantes incluyen a *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* [43].

2.10.2. Secreción de polisacáridos

Las PGPR desempeñan un papel central en la mejora del crecimiento de las plantas que a menudo se logra gracias a la formación de biopelículas, colonias masivas de células microbianas de una o varias especies en contacto permanente rodeada de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés) que secretan al medio [48].

Las plantas que son tratadas con bacterias productoras de exopolisacáridos tienen una mayor resistencia al estrés salino e hídrico debido a la mejora de la textura del suelo, los polisacáridos microbianos pueden adherirse a las partículas del suelo para construir microagregados y macroagregados, además los EPS microbianos crean una cápsula protectora y proporcionan un microambiente que retiene agua y se seca más lentamente así mismo pueden absorber cationes como Na^+ lo que los vuelve inaccesibles para las plantas en condiciones salinas [52].

En la matriz extracelular formada se producen una variedad de macromoléculas benéficas para el desarrollo de la planta también mejoran la disponibilidad del agua en las raíces [44]. Por otra parte, los polisacáridos de la pared celular y los exopolisacáridos son los elicitores, moléculas que activan la respuesta de resistencia sistémica en la planta, bióticos más descritos [53].

Existen numerosos estudios que han confirmado que las bacterias que producen biopelículas funcionan bien como agentes de biocontrol, ya que las biopelículas protegen a las plantas a través de la inducción de mecanismos de resistencia como resultado de la comunicación entre células por medio de detección quorum y la producción de antibióticos y otros compuestos antimicrobianos, en resumen las biopelículas de origen microbiano tienen un papel fundamental en la colonización de la raíz y en la promoción del crecimiento de las plantas al actuar como biofertilizantes al mejorar la fijación de N_2 y la absorción de micro y macronutrientes y agentes de biocontrol [44].

2.10.3. Producción de fitohormonas: ácido indol acético (AIA)

Las fitohormonas, son compuestos orgánicos eficaces en concentraciones muy bajas, de manera general son sintetizadas en una parte de la planta y se transportan a otra ubicación, interactúan con los tejidos diana específicos para estimular respuestas fisiológicas como la maduración de la fruta o el crecimiento de la planta, se reconocen cinco grupos principales: citoquinas, etileno, giberelinas, ácido abscísico y auxinas [43].

La mayoría de las PGPR tienen la capacidad para producir fitohormonas como giberelinas, citoquinas, auxinas y etileno que regulan y promueven el crecimiento de las plantas [14]. Las citoquinas, como la zeatina, son compuestos con estructura similar a la adenina que reciben su nombre debido a su influencia en la citocinesis o división celular en las plantas [52], la citoquinina es producida por *Pseudomonas fluorescens* aislada de la rizosfera de soya [43]. Las giberelinas afectan diferentes etapas del desarrollo de la planta ya que regulan la mayoría de las funciones fisiológicas como la germinación de las semillas, el alargamiento de los tallos, la floración, la fructificación y la senescencia, la inoculación con *P. putida* H-2-3 productora de giberelinas demostró mejorar el crecimiento de las plantas de soya en condiciones de sequía [52].

La capacidad para producir auxinas es el mecanismo más utilizado para explicar los efectos positivos que las PGPR presentan para estimular el crecimiento de las plantas, cerca del 80 % de los microorganismos de la rizosfera pueden sintetizar y liberar auxina como metabolito secundario [54].

Existen diferentes auxinas que pueden producirse de manera natural pero la más relevante conocida como la auxina principal es el ácido-3-indolacético (AIA), esta fitohormona estimula el crecimiento de las raíces mediante la expansión del tejido y la división celular, la formación de nódulos en las raíces, haces vasculares, así como en el vigor de las plántulas [50]. El AIA junto a la ACC desaminasa mejoran el crecimiento de la planta de forma sinérgica, el triptófano exudado de la raíz es utilizado por las PGPR asociadas

para transformarlo en AIA, una vez que es secretado por las bacterias es absorbido por las células vegetales que en conjunto con AIA sintetizado por la misma planta impulsa la proliferación y crecimiento de las células vegetales que a su vez estimulan la expresión del gen que codifica la enzima ACC sintasa cuya actividad conduce a la síntesis del etileno, una fracción de la ACC producida puede ser eliminada por las PGPR que producen ACC desaminasa, por lo que en condiciones de estrés ambiental reduce la respuesta de la planta y esta produce una menor cantidad de etileno lo que proporciona un estado en donde el AIA puede aumentar el crecimiento de la planta [52].

2.10.4. Compuestos volátiles: ácido cianhídrico (HCN)

Los microorganismos son capaces de sintetizar diversos compuestos orgánicos volátiles (COVs) con puntos de ebullición bajos y masas molares de 300 Da en promedio, son los responsables del aroma del yogurt, queso o vino, entre otros alimentos, así como del desagradable olor de los que se encuentran en estado descomposición. El papel ecológico de los COVs de origen microbiano es complejo, tienen propiedades antimicrobianas, pueden modular el crecimiento de las plantas (suprimen o estimulan) y actúan como señales de comunicación a larga distancia entre organismos [55].

Entre los COVs con propiedades antimicóticas encontramos alcoholes, aldehídos, cetonas y ácido cianhídrico, este último es producido por muchas rizobacterias y se postula juega un papel en el control biológico de patógenos pues inhibe el transporte de electrones, lo que, interrumpe el suministro de energía a la célula, además de inhibir el funcionamiento adecuado de algunas enzimas lo que conduce a la muerte de los organismos [56].

El HCN es sintetizado por algunas especies de *Chromobacterium*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*, este metabolito se forma a partir de la glicina por la HCN sintasa y generalmente se produce al final de la fase de crecimiento exponencial en condiciones de alta densidad celular y baja concentración de oxígeno [55]. En algunas investigaciones el

HCN producido por *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *Chromobacterium violaceum* mostró actividad antifúngica contra *R. solani* y *S. rolfsii* [57], mientras que *P. fluorescens* CHAO inhibió el crecimiento micelial de *Pythium in vitro* además de estimular la formación de pelos radiculares lo que indica que indujo y alteró las actividades fisiológicas de la planta [43].

2.10.5. Producción de pigmentos de fenazina

Las fenazinas son pigmentos heterocíclicos que contienen nitrógeno, un organismo es capaz de producir mezclas de hasta diez derivados de fenazina simultáneamente, en la actualidad se han descrito más de 50 compuestos de fenazina de origen natural, la cantidad y el tipo de fenazina que una cepa individual produce está determinada por las condiciones de crecimiento [58]. Estos metabolitos de bajo peso molecular son producidos por un número limitado de géneros bacterianos como las *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Brevibacterium* y *Streptomyces* [28].

Las *Pseudomonas* son organismos versátiles que tienen la capacidad de producir una variedad sorprendente de metabolitos secundarios antimicrobianos y han sido ampliamente estudiadas como BCA entre los antibióticos más efectivos que sintetizan se encuentran las fenazinas [17]. Las mezclas de fenazinas que producen dependen en gran medida de la cepa en cuestión, por ejemplo, la piocianina es una de las principales que sintetiza *P. aeruginosa*, mientras que *P. fluorescens* 2–79 produce esencialmente ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) a diferencia de *P. aureofaciens* 30–84 que además de PCA produce cantidades menores de 2-hidroziphenazina [58].

El amplio espectro que las fenazinas muestran contra hongos y otras bacterias no está claro, sin embargo, se conoce que la piocianina puede producir un radical anóxico relativamente estable al aceptar electrones, por lo que existe una clara posibilidad de que la acción antibiótica sea resultado de la toxicidad del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno que se producen en grandes cantidades debido a la presencia de la piocianina

[28].

2.10.6. Producción de sideróforos

El hierro es uno de los elementos más abundantes de la Tierra y es esencial para todos los seres vivos, sin embargo, este no está disponible en el suelo para la asimilación directa de los microorganismos y las plantas, sino que se encuentra en su forma oxidada como ión férrico (Fe^{3+}) a pH neutro y en condiciones aeróbicas forman minerales insolubles como goethita y la hematita (Fe_2O_3) [43]. Para superar este problema los microorganismos secretan sideróforos pequeñas moléculas peptídicas de bajo masa molecular (400-1000 daltons) que se unen Fe^{3+} con una afinidad muy alta y los transportan de vuelta a la célula microbiana donde es captado a través de un receptor que se encuentra en la membrana celular externa de la bacteria y lo dejan disponible para su crecimiento [46].

Algunos géneros de bacterias que secretan sideróforos son *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Geobacter* y *Enterobacter* que pueden reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} la forma que utilizan las plantas, los sideróforos secretados por estas bacterias actúan como agentes extracelulares solubilizadores de hierro por lo que mejoran el crecimiento y el desarrollo de las plantas al aumentar la accesibilidad a este elemento en el suelo que rodea la raíz [43].

Los sideróforos bacterianos se han clasificado de acuerdo a sus características estructurales, grupos funcionales y tipos de ligando en hidroxamatos, carboxilatos, catecolatos de fenol y pioverdinas, este último grupo de sideróforos es producido por varias especies de *Pseudomonas* fluorescentes, que han sido relacionadas con su capacidad para suprimir organismos fitopatógenos ya que es un potente sideróforo, es decir con alta afinidad al ión férrico por lo que puede inhibir el crecimiento de bacterias y hongos que presenten sideróforos menos potentes en condiciones de escasez de hierro [46].

2.10.7. Secreción de enzimas líticas

Otro de los mecanismos que las PGPR tienen para atacar patógenos es una actividad hiperparasitaria a través de la secreción de hidrolasas de pared celular [43], estas enzimas incluyen quitinasas que degradan quitina parte integral de la pared celular de hongos, glucanasas que degradan otro carbohidrato de la pared celular, lipasas que degradan lípidos asociados a dicha pared, así como, proteasas que degradan las proteínas asociadas a la pared celular, además de pectinasas y amilasas; todas estas enzimas, en cierta medida, pueden lisar individualmente las células fúngicas [54].

En una investigación en donde utilizaron una cepa de *Pseudomonas stutzeri* que produce laminarasas y quitinasas extracelulares capaces de digerir y lisar el micelio de *Fusarium solani* que causa pudrición de la raíz, también lograron reducir la incidencia de las enfermedades causadas por otros hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Sclerotium rolfsii* [46]. La capacidad de producir quitinasas extracelulares se considera crucial para que *Serratia marcescens* actúe como antagonista contra *S. rolfsii* y para *Paenibacillus* sp. cepa 300 que junto con las glucanasas que secretan lisan las paredes celulares de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* [43].

2.11 Consorcios microbianos

Los consorcios microbianos son ubicuos en la naturaleza, desde la antigüedad los microorganismos han estado presentes en asociación con plantas y animales interactuando en un equilibrio dinámico que ha permitido la creación de múltiples sistemas de comunicación, por ejemplo, los mensajes químicos en la rizosfera de las plantas que tienen un papel fundamental en el ecosistema agrícola, ya que, regulan todos los procesos biogeoquímicos en el suelo incluidos la degradación de contaminantes, el ciclo de nutrientes, la descomposición y el mantenimiento de la materia orgánica, el control de patógenos y la reducción de los gases de efecto invernadero, por lo que, el aumento en la biodiversidad microbiana ha mostrado estabilizar los agroecosistemas y aumentar su resiliencia al cambio climático [59].

Los consorcios microbianos están formados por microorganismos de diferentes especies o de la misma especie, pero de diferente cepa [60], en estos, los miembros interactúan entre sí compartiendo nutrientes, alimentándose de forma cruzada y repartiendo tareas complejas, por ejemplo, la degradación de lignocelulosa que a menudo requiere la participación de varios microorganismos [20].

Diferentes combinaciones de rizobacterias o microorganismos promotores del crecimiento vegetal viven junto a microorganismos no PGPR en la rizosfera de las plantas, debido a este estilo comunitario existe la tendencia de mezclar agentes de biocontrol de diferentes especies que presentan actividades promotoras del crecimiento para mejorar los resultados agrícolas deseados [59].

En comparación con la aplicación de cepas individuales la aplicación de consorcios microbianos con cepas eficientes para el control biológico representa una técnica superior en el manejo de las enfermedades en plantas, en un consorcio los microorganismos que son compatibles, es decir, que no tienen un efecto supresor sobre otras cepas cuando se co-cultivan en un medio común, tienen un impacto mayor tanto en la promoción

del crecimiento como en la supresión de enfermedades, ya que mejoran la consistencia, confiabilidad y eficacia de los microorganismos en diversas condiciones ambientales y del suelo, además cada cepa que forma el consorcio aporta diferentes mecanismos de biocontrol [20].

Capítulo 3

Hipótesis

El desarrollo micelial en *S. rolfsii* es inhibido por la acción antifúngica de consorcios de bacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Pseudomonas* spp, además de que los metabolitos secundarios producidos por estas bacterias afectan la producción y la germinación de los esclerocios, protegiendo a las plantas de jitomate contra este fitopatógeno.

3.1 Objetivo general

Determinar la capacidad antagónica de aislados de *Pseudomonas* spp. para inhibir el crecimiento micelial, así como la producción y germinación de los esclerocios de dos aislados de *S. rolfsii* para conformar consorcios con dichas bacterias y realizar bioensayos para determinar su efecto inhibitorio sobre el fitopatógeno *in vitro* al igual que su potencial efecto bioprotector que estos consorcios brindan en plantas de jitomate.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la competencia antagónica de aislados y consorcios de *Pseudomonas* spp. para inhibir el crecimiento micelial de *S. rolfsii*.
- Analizar el efecto de aislados y consorcios de *Pseudomonas* spp. en la germinación y producción de los esclerocios de *S. rolfsii* en condiciones *in vitro*.
- Identificar a nivel molecular y determinar la relación filogenética de las bacterias caracterizadas.
- Realizar bioensayos para determinar la capacidad de bioprotección del consorcio de cepas de *Pseudomonas* spp. que ejerce en las plántulas de jitomate contra *S. rolfsii* en condiciones de invernadero.

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1 Organismos utilizados

Los aislados de *Pseudomonas*: 1228, 1230, 1232, 1234, 1236, 1238, 1240, 1242, 1244, 1251 y 1252 utilizados en esta investigación forman parte del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular (LAMIMO) de la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada (UMBA) de la Facultad de Ciencias Naturales de esta universidad. Estas cepas fueron aisladas y caracterizadas por Torres Lara (2020) [61] de la raíz y suelo de cultivos de fresa *Fragaria ananassa* variedad Camino Real de una huerta con manejo orgánico en El Ejido la Calera en Irapuato, Gto. Las bacterias fueron sembradas en Agar (AN en g/L 5 Peptona, 3 Extracto de carne, 15 Agar) o Caldo Nutritivo (CN en g/L 5 Peptona, 3 Extracto de carne) según corresponda e incubados a 28 °C por 24 h. Se utilizaron dos cepas de *S. rolfsii*, AHE proveniente del Estado de Guanajuato y HAA del Estado de Nuevo León. Ambos aislados se sembraron en Agar Papa Dextrosa (PDA en g/L 39) e incubados a temperatura ambiente hasta por 30 días para la obtención de esclerocios.

4.2 Caracterización e identificación fenotípica de los aislados de *Pseudomonas* spp.

La caracterización e identificación bioquímica de los aislados se realizaron diferentes pruebas, como oxidasa, catalasa y tinción Gram, además de las pruebas de la fermentación de la glucosa, la descarboxilación de la lisina, la hidrólisis de la urea, así como, las pruebas de motilidad y uso de citrato como única fuente de carbono, todas se realizaron por triplicado. También se utilizaron los sistemas estandarizados de identificación API 20 E y API 20 NE que permiten identificar bacilos Gram negativos. Las pruebas se realizaron según las instrucciones del fabricante (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Para la interpretación de los resultados proporcionados por ambos sistemas, se asignaron a nivel de especie los aislados cuya identificación fue excelente, muy buena, buena o aceptable.

4.3 Identificación molecular: secuenciación del gen 16S ARNr

4.3.1. Extracción de ADN

Los 11 aislados utilizados en esta investigación nueve fueron previamente analizados mediante la amplificación y secuenciación de la región que codifica el gen de la ARNr 16S secuenciados por [61]. Para los aislados restantes se realizó la extracción de ADN de la siguiente manera, las bacterias fueron sembradas en CN e incubadas a 28 °C por 24 h con agitación constante a 150 rpm, se centrifugaron a 7000 rpm por 7 min, la pastilla obtenida fue colocada en un mortero de porcelana estéril para realizar la lisis mecánica de las células mediante la maceración con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. La muestra se recuperó en dos tubos de plástico de 1.5 mL, enseguida se añadieron 200 μ L de la solución amortiguadora de lisis TSNTE (2 % Tritón X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, pH 8) y perlas de vidrio estériles, a continuación, se añadieron 300 μ L de solución fenol-cloroformo y se llevó al vortex por 4 min. Se agregaron 200 μ L del amortiguador TE (Tris-EDTA 1M) después la muestra fue centrifugada a 13000 rpm por 8 min, se recuperó la fase acuosa y se enjuagó con 500 μ L de cloroformo puro. Después se añadió 1 ml de etanol frío al 100 %, se mezcló por inversión y se incubó por 1 h a -20 °C.

Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 8 min y se decantó el sobrenadante. Para resuspender la pastilla se añadieron 400 μ L de agua grado de biología molecular con 30 μ g de RNAsa 1 y se incubaron por 20 min a 37 °C. Después se añadieron 10 μ L de acetato de sodio, 1 mL de etanol al 100 % y se incubaron por 5 min a -20 °C, pasado el tiempo de incubación se centrifugó el tubo 12000 rpm por 8 min y se descartó el sobrenadante, se añadieron 400 μ L de etanol al 70 % y se centrifugó por 5 min a 13000 rpm, después se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por 5 min. Enseguida

se agregó 80 μL de agua grado de biología molecular y para determinar su concentración y pureza se cuantificó en el Nanodrop 2000 spectrophotometer 2 μL . Por último, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1 % con 5 μL de la muestra de ADN teñida con bromuro de etidio [62].

4.3.2. Amplificación del gen 16S ARNr y secuenciación

Se realizó la amplificación de la región V1-V9 del gen 16S ARNr por medio de PCR utilizando los cebadores universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT) que amplifican un fragmento de 1465 pb [63]. Para la reacción de PCR se utilizaron las siguientes concentraciones: 5.4 μL Agua Grado Biología Molecular (GBM), 1.25 μL Buffer DreamTaq, 0.2 μL dNTPs, 0.25 μL del cebador 27f, 0.25 μL del cebador 1492r y 5 μL de la muestra de ADN de los aislados. La amplificación se realizó en termociclador BioRad Thermal Cycler T100 bajo las condiciones siguientes: la PCR un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos: desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación de los cebadores a 62 °C por 30 s, elongación a 72 °C por 1:50 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. Posteriormente se realizó la visualización del fragmento amplificado en gel de agarosa al 1 %, se utilizó un marcador de peso molecular 1 Kb y se tiñó con 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Bromuro de etidio, se visualizó con luz ultravioleta en el fotodocumentador BioRad The Gel Doc XR+ System. Para la purificación de los productos de PCR se utilizó el Kit Zymoclean DNA Recovery según las instrucciones del fabricante, una vez purificados los productos de PCR se secuenciaron por el método de Sanger en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Cinvestav-Irapuato.

4.4 Análisis filogenético de los aislados de *Pseudomonas* spp.

Las secuencias del marcador molecular 16S ARNr fueron utilizadas para el análisis filogenético de los 11 aislados bacterianos. Se realizó un árbol filogenético para cada uno de ellos, las secuencias se alinearon mediante el programa Mesquite [64] y se estimó las distancias evolutivas mediante distancia por pares, se determinó la bondad de ajuste del modelo evolutivo a utilizar, así como los parámetros a utilizar para cada modelo en el programa MEGA 11 [65], los árboles filogenéticos obtenidos fueron editados en el programa FigTree [66].

4.5 Caracterización fisiológica de los aislados bacterianos como PGPR

4.5.1. Solubilización de fosfatos

Para determinar si los aislados solubilizan fosfatos fueron sembrados en Agar Pikovskaya (PVK, en g/L, 10 glucosa, 0.5 extracto de levadura, 5 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0.5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 KCl, 0.008 $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.004 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 18 agar, 0.04 % de bromocresol como) [61] que contiene 5 % de fosfato tricálcico como única fuente de fosfato inorgánico insoluble mezclado con azul de bromofenol como indicador de pH [67]. Los aislados fueron inoculados en 5 mL de CN e incubados a 28 °C por 24 h, posteriormente se ajustó la densidad óptica a 1 = 600 nm y se sembraron 20 μL de cada cultivo en el Agar PKV, se incubaron a 28 °C por 3 días. La prueba se consideró positiva si se observó un halo amarillo translúcido alrededor de la colonia y se calculó el índice de solubilización de fosfatos (ISF) mediante la fórmula 4.1 [68].

$$\text{ISF} = \frac{\text{Diámetro total (colonia + zona halo)}}{\text{Diámetro de la colonia}} \quad (4.1)$$

4.5.2. Producción de exopolisacáridos

Los aislados fueron sembrados en matraces con 25 mL de Caldo Soya Trypticaseína, incubados a 28 °C en agitación constante 150 rpm por 6 días. Se recuperaron 20 mL de cada cultivo en tubos falcón y se centrifugaron a 8000 rpm durante 6 min, para precipitar los exopolisacáridos del sobrenadante la fase acuosa fue depositada en un matraz con dos volúmenes de acetona fría [67] y colocados en refrigeración a 4 °C por 5 días. Se recuperaron los exopolisacáridos mediante filtración con ayuda de un rectángulo de magitel que fue colocado en horno de secado por espacio de una hora. El magitel fue pesado antes y

después para determinar la producción de exopolisacáridos en mg por g de peso seco. El experimento se realizó por triplicado y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente en r [69].

4.5.3. Producción de ácido indol acético (AIA)

Para determinar la producción de ácido indolacético por parte de los aislados se sembraron en AN se incubaron a 28 °C por 24 h, se preparó CN suplementado con Tryptófano a 150 mg por cada 100 mL, se vertieron 5 mL del medio en tubos de ensaye y se inoculó con una asada de cada uno de los aislados por separado, estos se incubaron por 24 a 48 h a 28 °C, posteriormente se agregaron 5 gotas del reactivo de Kovacs (150 mL Alcohol isoamílico, 10g Paradimetilaminobenzaldeído, 50 mL HCl). Segundos después la prueba se consideró positiva por la formación de un anillo de color rosa a rojo en la capa de reactivo sobre el medio, la prueba es indol negativo cuando la capa de reactivo permanece amarilla o se observa ligeramente turbia [70].

4.5.4. Producción de ácido cianhídrico (HCN)

Se realizó el método pícrico alcalino de la siguiente manera los aislados fueron sembrados en AN suplementado con glicina a 4.4 g/L, en la tapa de la caja de Petri se colocaron discos de papel filtro Whatman n°1 estéril empapado con una solución de ácido pícrico al 2.5 % y carbonato de sodio Na₂CO₃ al 12.5 %, las cajas fueron selladas con una película de PVC para evitar que se escaparan los gases e incubadas a 28 °C por hasta 3 días. El cambio de color de amarillo a naranja o rojo implicó niveles de producción de HCN [26].

4.5.5. Producción de piocianina y otros pigmentos de fenazina

Para verificar la producción de piocianina y otros pigmentos de fenazinas, los aislados se cultivaron en CN por 24 h a 28 °C, se ajustó la densidad óptica de cada cultivo a 1

= 600 nm y se sembraron 20 μL de cada bacteria en Agar Pseudomonas P (en g/L 20 Peptona, 1.4 MgCl_2 , 10 K_2SO_4 , 15 Agar, Glicerol 10 mL) donde la incorporación de cloruro de magnesio y sulfato de potasio estimula la de piocianina y piorrubina [71]. Las placas se incubaron a 28 °C por hasta 3 días, se revisaron a las 24, 48 y 72 h. La prueba se consideró positiva al observar los pigmentos que difunden y tiñen el agar, la piocianina tiñe el medio de color azul, el ácido fenacina-L-carboxílico de amarillo anaranjado y se observa cristalizado, oxiclorafina de amarillo pálido o piurrubina que tiñe el medio rosa, rojo o marron rojizo [72].

4.5.6. Producción de pioverdina

En cuanto a la producción de pigmentos fluorescentes los aislados fueron cultivados en CN por 24 h a 28 °C se ajustó la densidad óptica a 1 = 600 nm y se sembraron 20 μL de cada aislado en Agar Pseudomonas F (en g/L 10 Digerido pancreático de caseína, 10 Peptona proteosa N° 3, 1.5 K_2HPO_4 , 1.5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 Agar, Glicerol 10 mL) se incubaron a 28 °C por 3 días, las placas se revisaron a las 24, 48 y 72 h. La prueba se consideró positiva si se observa una zona fluorescente en el agar que rodea el crecimiento. Las placas se revisaron bajo una lámpara de luz ultravioleta (260 nm), las *Pseudomonas fluorescentes* producen un pigmento amarillo verdoso brillante que se difunde en el agar [71, 72].

4.5.7. Producción de quitinasas

Para determinar la producción de quitinasas los aislados fueron sembrados en 5 ml CN e incubados a 28 °C con agitación constante a 150 rpm por 24 h, se ajustó la densidad óptica de los cultivos a 1 = 600 nm, se inocularon 20 μL de cada cultivo en placas con Agar Quitina (en g/L 6 Na_2HPO_4 , 3 KH_2PO_4 , 10 quitina coloidal, 1 NH_4Cl , 0.5 NaCl , 0.05 extracto de levadura, 5 % de agar) [73] que contiene quitina coloidal como única fuente de carbono. Después de 6 días de incubación a 28 °C se calculó la Actividad Enzimática Relativa (AER) mediante la fórmula 4.2 que permite representar de manera

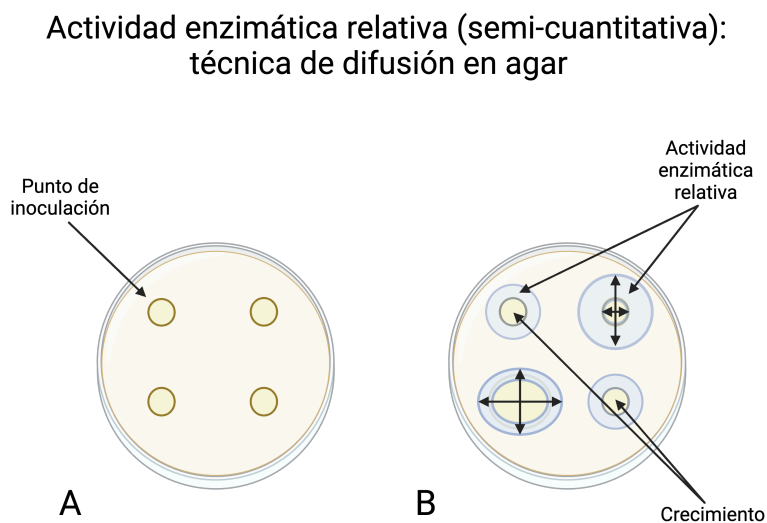


Figura 5: Técnica de difusión en agar para determinar la actividad enzimática relativa. A.- Punto de inoculación del aislado bacteriano. B.-Se medirán en mm tanto el diámetro de crecimiento como el diámetro de actividad enzimática para determinar AER. Modificado de [74]. Creado con BioRender.com

semicuantitativa el rango de espectros de actividad enzimática de los microorganismos (Figura) [74], las placas fueron empapadas con una solución de rojo congo durante 15 min. La prueba se consideró positiva si se formó un halo claro alrededor de la colonia [75].

$$\text{AER} = \frac{\text{Diámetro de la actividad enzimática en mm}}{\text{Diámetro del crecimiento en mm}} \quad (4.2)$$

4.5.8. Producción de amilasas

También se realizó el ensayo de la producción de amilasa a partir de cultivos líquidos de los aislados en CN y ajustada su densidad óptica, 20 μL de cada cultivo en cajas de Petri con agar almidón (en g/L 2 Peptona, 6 NaCl, 2 extracto de levadura, 2 almidón, 20 Agar) se incubaron a 28 °C por 6 días, se calculó la AER con la fórmula 4.2, enseguida

las placas fueron empapadas con Lugol por 30 min, después se enjuagaron con agua 4 veces. La prueba se consideró positiva si se observó un halo transparente alrededor de la colonia [74].

4.5.9. Producción de lipasas

Para ensayar la actividad lipasa de los aislados bacterianos se realizaron cultivos líquidos de los mismos se incubaron a 28 °C por 24 h y se ajustó su densidad óptica a $1 = 600$ nm fueron sembrados 20 μ L en medio agar lipasa (en g/L 10 Peptona, 5 NaCl, 20 Agar, 0.1 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 10 mL de Tween 80) también conocido como medio Sierra [76]. Las placas se incubaron a 28 °C por 3 días, la prueba se consideró positiva al observar un precipitado blanco alrededor de la colina como indicadora de actividad lipasa, también se calculó la AER mediante la fórmula 4.2.

4.5.10. Producción proteasas

Para determinar la producción de proteasas por parte de los aislados se realizó la prueba de la hidrólisis de la gelatina para ello se utiliza medio de Gelatina Nutritivo (GN en g/L 5 Peptona, 3 Extracto de carne, 120 Gelatina), en donde la gelatina actúa como sustrato para la gelatinasa además de agente solidificante. Para realizar esta prueba los aislados fueron sembrados en cajas de Petri de 35 mm con AN e incubados a 28 °C por 24 h, posteriormente cada uno de los aislado fue sembrado en tubos de ensaye con 25 mL de medio GN en pico de flauta por medio del método de punción, los tubos inoculados se incubaron a 28 °C por 24 a 72 h. La prueba se consideró positiva si después de refrigerar los tubos a 4 °C por 3 h el medio seguía líquido [77].

4.5.11. Pruebas de compatibilidad

Para determinar las combinaciones de los aislados que tienen potencial de efectos aditivos y sinérgicos se realizó la prueba de compatibilidad entre cada dos aislados mediante

el método modificado de Kirby-Bauer que permite determinar la susceptibilidad y sensibilidad entre bacterias al observar la presencia o ausencia de crecimiento al sembrar un aislado sobre otro, esto como una medida indirecta de la capacidad de una bacteria para inhibir la otra [78].

Los aislados se cultivaron en CN por 24 h a 28 °C con agitación constante 150 rpm y se ajustó la densidad óptica a 0.2 = 600 nm para el aislado 1 y se sembraron 160 μ L en una placa con Agar Mueller-Hinton, se estriaron con un hisopo estéril y se dejaron secar en campana de flujo laminar por espacio de 10 min. A partir de cultivos líquidos de cada aislado en CN e incubados a 28 °C con agitación constante 150 rpm, se ajustó la densidad óptica a 1 = 600 nm y se inocularon 10 μ L del aislado 2 sobre el tapete del aislado 1, se dejaron secar por 10 min, se incubaron a 28 °C por 3 días. La prueba se realizó 2 veces y se consideró positiva al haber crecimiento (ausencia de halo de inhibición).

4.6 Formulación de consorcios microbianos

Para establecer los consorcios se tomó en cuenta: la compatibilidad entre bacterias, así como la mayor cantidad de características promotoras del crecimiento de las plantas y antagónicas para ser incluidos en éste. El consorcio se preparó de la siguiente manera: a partir de cultivos sólidos frescos (24 h) se inocularon en 5 ml de CN, se incubaron a 150 rpm y 28 °C por 48 h, se ajustó su densidad óptica a $1 = 600 \text{ nm}$ y se prepararon como consorcios microbianos líquidos mezclando volúmenes iguales de cultivos líquidos de cada aislado (1:1, v/v) [79, 80] en CN incubados por 24 h a 28 °C en agitación constante a 150 rpm y ajustada su densidad óptica a $1 = 600 \text{ nm}$.

4.7 Experimentos de confrontación: consorcios microbianos vs *S. rolfsii*

Una vez formulados los consorcios se utilizaron para realizar diferentes pruebas de cultivo dual para determinar la inhibición en el crecimiento micelial y en la producción de esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii*, el análisis estadístico de las pruebas se realizó en el programa Rstudio [69] y se utilizaron varias pruebas dependiendo de los datos obtenidos, las pruebas se detallan a continuación.

4.7.1. Difusión de los metabolitos secundarios en el medio de cultivo: método del papel celofán

Se crecieron los consorcios (apartado 4.6), enseguida en una caja de PDA (caja de Petri de 90 mm) se cubrió toda la superficie de la placa con un disco de membrana de celofán esterilizada [81], se inocularon 200 μ L de cada uno de los consorcios por separado en el centro de la membrana se estrió con hisopo estéril y se dejó secar en campana de flujo laminar por 5 min, después las placas se incubaron a 28 °C por 96 h. Posteriormente en condiciones asépticas y con ayuda de unas pinzas flameadas, se retiró la membrana de celofán con el consorcio microbiano cultivado y se colocó en el centro de la caja de Petri, impregnada de los metabolitos difusibles producidos por los consorcios, un disco de micelio de 6 mm de alguno de los dos aislados de *S. rolfsii* en crecimiento activo (5 días de incubación), las placas se incubaron a temperatura ambiente aprox. 30 °C por 7 días. Para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento se utilizó la fórmula 4.3 [82], el crecimiento del fitopatógeno se midió como la distancia entre el punto de colocación del disco fúngico y los bordes del crecimiento activo del hongo [83]. Se incubó hasta por 30 días para conocer el efecto en la producción de esclerocios, para ello se tomó una fotografía de la placa de PDA y éstos se contaron con el programa ImageJ [84]. El porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios se determinó utilizando

la fórmula 4.4. El experimento se realizó por triplicado, los datos se analizaron con el programa Rstudio [69].

$$\% \text{Inhibición} = \sum \frac{R_1 - R_2}{R_2} \cdot 100 \quad (4.3)$$

Donde:

R_1 = Crecimiento radial del hongo en presencia del consorcio

R_2 = Crecimiento radial del fitopatógeno en ausencia del consorcio

$$\% IPE = \sum \frac{E_c - E_t}{E_c} \cdot 100 \quad (4.4)$$

Donde:

E_c = Esclerocios producidos por el hongo en ausencia del consorcio

E_t = Esclerocios producidos por el fitopatógeno en presencia de los consorcios

4.7.2. Confrontación dual con barrera

Para determinar el efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios microbianos sobre el crecimiento micelial y producción de esclerocios se realizó un ensayo de cultivo dual, se prepararon cajas de Petri de 90 mm con 2 divisiones, de un lado se vertió AN y del otro lado PDA, se prepararon los consorcios de la forma descrita anteriormente (apartado 4.6), y se inocularon 250 μL de cada consorcio por separado en la parte de AN de la caja de Petri, se estrió con hisopo estéril y se secó en campana de flujo laminar por 5 min, enseguida se colocó un disco de micelio de 6 mm de *S. rolfsii* en crecimiento activo (5 días de incubación) en la parte de la caja de Petri con PDA, las

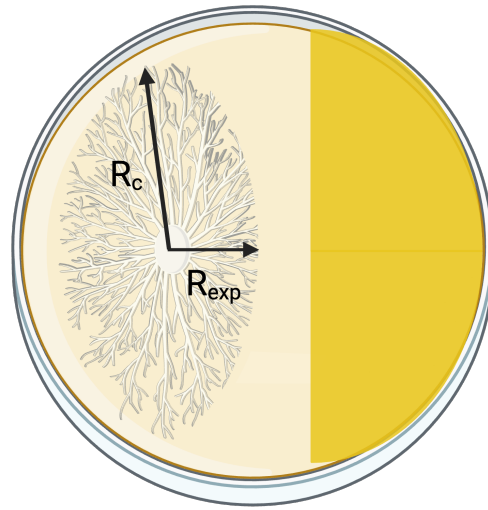


Figura 6: Tasa de inhibición del crecimiento radial. Del lado derecho de la placa crece el tapete bacteriano de los consorcios mientras que del lado izquierdo crece el micelio del hongo. R_c representa el diámetro más largo del micelio del hongo, R_{exp} representa el diámetro horizontal. Creado con BioRender.com

placas se sellaron con una película de PVC para evitar que se escaparan los compuestos volátiles y se incubaron a temperatura ambiente por hasta 30 días, a los 7 días se determinó la inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula 4.5 en donde el diámetro horizontal muestra el efecto inhibitorio de los consorcios sobre el crecimiento micelial del fitopatógeno (Figura 6) [85], a los 30 días los esclerocios se contaron mediante el programa ImageJ [84] y se calculó el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios IPE utilizando la fórmula 4.4, el experimento se realizó por triplicado, los datos se analizaron con el programa Rstudio [69].

$$\text{Tasa de inhibición} = \sum \frac{R_c - R_{exp}}{R_c} \cdot 100 \quad (4.5)$$

4.7.3. Confrontación dual sin barrera

Para realizar el ensayo de cultivo dual sin barrera, se prepararon cajas de Petri de 90 mm con PDA, en condiciones asépticas y con ayuda de un bisturí flameado se cortaron 3 cm de PDA del borde de la caja hacía el centro de la misma, dicha parte se rellenó con AN en esta se sembraron los consorcios de la manera descrita (apartado 4.7.2). Las placas se sellaron con una película de PVC para evitar que los compuestos volátiles producidos por los consorcios escaparan y se incubaron a temperatura ambiente hasta por 30 días, a los 7 días de incubación se determinó la tasa de inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula anterior 4.5, a los 30 días los esclerocios se contaron mediante el programa ImageJ [84] y se calculó el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios IPE utilizando la fórmula 4.4, el experimento se realizó 3 veces.

4.7.4. Efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios sobre la germinación de los esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii*

Para determinar el efecto de los compuestos volátiles sobre los esclerocios de *S. rolfsii* se realizó la siguiente prueba que consistió en tubos de ensayo de 50 mL con 25 mL de AN en pico de flauta en donde se inocularon 160 μ L tubos de ensayo con AN con los consorcios previamente preparados como se detallo con anterioridad (apartado 5.6.3), se estriaron con hisopo estéril, enseguida en una bolsa cuadrada de tela permeable esterilizada de 3 cm de largo se depositaron 12 esclerocios de ambos aislados de *S. rolfsii* por separado, con ayuda de unas pinzas flameadas se colocaron en la boca del tubo de ensayo, los tubos se sellaron con una película de PVC y se incubaron a 28 °C por 7 días. Posteriormente los esclerocios fueron recuperados con ayuda de unas pinzas flameadas colocados en cajas de Petri de 90 mm con PDA, se sembraron 8 esclerocios en cada caja de Petri y se incubaron a temperatura ambiente hasta 30 días, se determinó el porcentaje de germinación de los esclerocios a los 7 días de incubación mediante la fórmula 4.6

[86], a los 30 días se contaron los esclerocios producidos en los tratamientos mediante el programa ImageJ [84] y se calculó el IPE mediante la fórmula 4.4, se realizaron dos réplicas biológicas con dos repeticiones cada una, los datos obtenidos se analizaron con el programa Rstudio [69].

$$\%germinación = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de esclerocios germinados}}{\text{Total de esclerocios}} \cdot 100 \quad (4.6)$$

4.8 Efecto de los filtrados libres de células de los consorcios sobre el crecimiento micelial y producción de esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii*

Para este ensayo se prepararon 125 mL de los consorcios CS3 y CS4 de la manera descrita anteriormente y una vez mezclados los consorcios se incubaron a 28 °C en agitación constante a 150 rpm durante 96 h, enseguida se transfirieron 25 mL de cada consorcio a tubos de plástico cónicos de 50 mL estéril y se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min, esto se realizó dos veces. Posteriormente se recuperó la fase acuosa y se filtró a través de membrana de 0.45 μm (Millipore)/47 mm de diámetro (Sistema Swinnex). Al filtrado se agregaron 100 μ de Kanamicina (50 mg/mL), se incubó durante 3 h a 28°C en agitación [87]. Por otra parte, se preparó PDA 2X una vez estéril junto a los filtrados, en volúmenes iguales (1:1, v/v), se prepararon cajas de Petri de 90 mm, como control se utilizó agua destilada estéril en la misma proporción. En las placas preparadas con los filtrados libres de células (FLC) se sembraron ya sea un disco de micelio de 6 mm con crecimiento activo de ambos aislados de *S. rolfsii* (5 días de incubación en PDA) o se sembraron de manera equidistante 8 esclerocios de cada aislado del fitopatógeno. Se realizaron dos repeticiones biológicas con dos réplicas cada una, a los 7 días se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio mediante la fórmula 4.5, a los 30 días se contaron los esclerocios producidos en el programa ImageJ [84] y se determinó el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios con la fórmula 4.4.

4.9 Efecto biprotector de los consorcios en planta de jitomate

Para ensayar el efecto inhibitorio de los consorcios CS3 y CS4 en planta de jitomate se realizó lo siguiente, se prepararon los consorcios de la forma descrita con anterioridad, enseguida se colocaron 60 semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) tipo “Saladet” en tubos falcón de 50 mL se agregaron 5 mL de los consorcios por separado, como control se utilizó 5 mL de CN, se incubaron a 28 °C y 150 rpm por 3 h, enseguida se colocaron en charolas de germinación que contenían una mezcla de suelo general del CINVESTAV Irapuato, se sembraron 50 semillas por tratamiento. Las semillas se regaron con agua de grifo cada tercer día y una vez a la semana se inocularon 1 mL del consorcio correspondiente por cada pozo. A las seis semanas las plántulas de jitomate fueron trasplantadas en vasos de plástico de 525 mL bajo las mismas condiciones. Después de seis semanas las plántulas fueron infectadas con uno de los aislados de *S. rolfsii* para ello en condiciones asépticas se colocó un disco de membrana de celofán sobre cajas de Petri de 60 mm con PDA, enseguida se colocó en el centro de la caja con la membrana de celofán un de micelio de 6 mm con crecimiento activo del hongo (5 días de incubación), las placas se incubaron a temperatura ambiente por 5 días, posteriormente en condiciones asépticas se cortaron con ayuda de un bisturí con la navaja flameada en ocho rectángulos del mismo tamaño, las plántulas infectadas se inocularon con 1 mL de consorcios CS3 o CS4 o CN una vez a la semana. La incidencia de la enfermedad (IE) se determinó a los 30 días después de la infección con alguno de los aislados de *S. rolfsii* mediante la fórmula 4.7 [88], además se determinó el grado de severidad de la enfermedad mediante la escala que se encuentra en la tabla 1 [89] y el índice de severidad (IS) con la fórmula 4.8 [88], por último, para determinar el índice de eficacia de biocontrol se utilizó la fórmula 4.9 [89].

$$\%IE = \frac{N^{\circ} \text{ de plantas atacadas}}{N^{\circ} \text{ de plantas examinadas}} \cdot 100 \quad (4.7)$$

Tabla 1: Escala para determinar el grado de severidad de la enfermedad

Escala	Síntomas
0	El crecimiento del jitomate fue normal
1	1-25 % de hojas amarillas y marchitamiento inicial del tallo del jitomate
2	26-50 % de hojas amarillentas y comienzo de la muerte del tallo
3	51-75 % de hojas necróticas amarillentas y muerte progresiva de tallos
4	76-100 % de tejido necrótico, micelio en crecimiento y esclerocios
5	Planta marchita

$$IS = \sum \frac{(\text{Plantas con el mismo grado de infección}) (\text{Grado de infección})}{(\text{Total de plantas}) (\text{Mayor grado de infección})} \cdot 100 \quad (4.8)$$

$$\text{Eficacia biocontrol} = \frac{IS \text{ del control} - IS \text{ del consorcio}}{IS \text{ del control}} \cdot 100 \quad (4.9)$$

4.10 Promoción del crecimiento vegetal de los consorcios microbianos en planta de jitomate

Para evaluar el efecto de promoción del crecimiento vegetal de los consorcios CS3 y CS4 se realizó el siguiente experimento 60 semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) tipo “Saladet” se colocaron en tubos falcón de 50 mL se agregaron 5 mL de los consorcios por separado y como control se utilizó CN se incubaron a 28 °C por 3 h y se sembraron en charolas de germinación con una mezcla de suelo general del Cinvestav-Irapuato esterilizado en autoclave, una vez a la semana se inocularon con 1 mL de consorcio preparados como se describió antes 4.6 y se regaron dos veces a la semana con agua de grifo. El porcentaje de germinación fue registrado una vez a la semana durante 6 semanas. Después de 4 semanas las plántulas de jitomate se trasplantaron en vasos de plástico de 525 mL bajo las mismas condiciones experimentales. Después de seis semanas se arrancó suavemente toda la planta y se lavaron las raíces con agua corriente para eliminar el suelo adherido y se midió el crecimiento aéreo de las plantas, así como la longitud de la raíz.

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1 Características fenotípicas de los aislados de *Pseudomonas* spp.

En el cepario utilizado contamos con 11 aislados bacterianos, se encontró que tiene diferencias morfológicas entre ellas (Tabla 2). En la Figura 7 se observan dos de las bacterias aisladas de la rizosfera y cultivo de fresas utilizadas en este estudio crecidas en AN e incubados a 28 °C por 24 h.

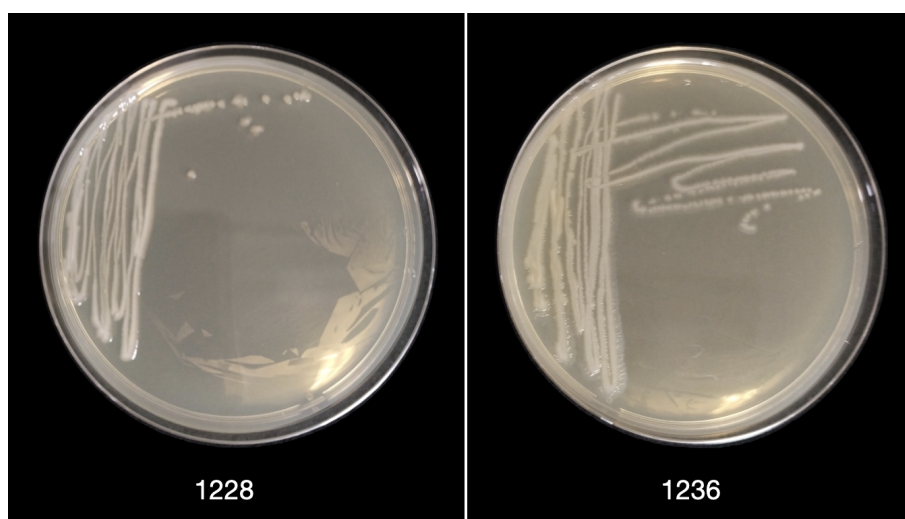


Figura 7: Morfología de los aislados bacterianos. Se muestra dos de los aislados creciendo en AN e incubados a 28 °C por 24 h.

Tabla 2: Características morfológicas de los aislados bacterianos

Número	Aislado	Color	Consistencia	Forma	Borde
1	1228	Blanco	Creмоса	Irregular	Entero
2	1230	Blanco	Creмоса	Puntiforme	Entero
3	1232	Blanco	Viscosa	Irregular	Ondulado
4	1234	Amarillo	Creмоса	Irregular	Lobulado
5	1236	Amarillo	Creмоса	Irregular	Regular
6	1238	Amarillo	Viscosa	Fusiforme	Entero
7	1240	Amarillo	Creмоса	Irregular	Lobulado
8	1242	Amarillo	Creмоса	Irregular	Lobulado
9	1244	Amarillo	Creмоса	Puntiforme	Lobulado
10	1251	Amarillo	Creмоса	Irregular	Entero
11	1252	Blanco	Creмоса	Irregular	Lobulado

5.2 Identificación de la colección de bacterias por pruebas bioquímicas

Se realizaron tinción de Gram para todos los aislados bacterianos y se encontró que todos son bacilos Gram negativos, dato que corresponde a lo esperado para el género *Pseudomonas*, en la Figura 8 se observan los resultados de esta prueba para los aislados 1242 y 1252.

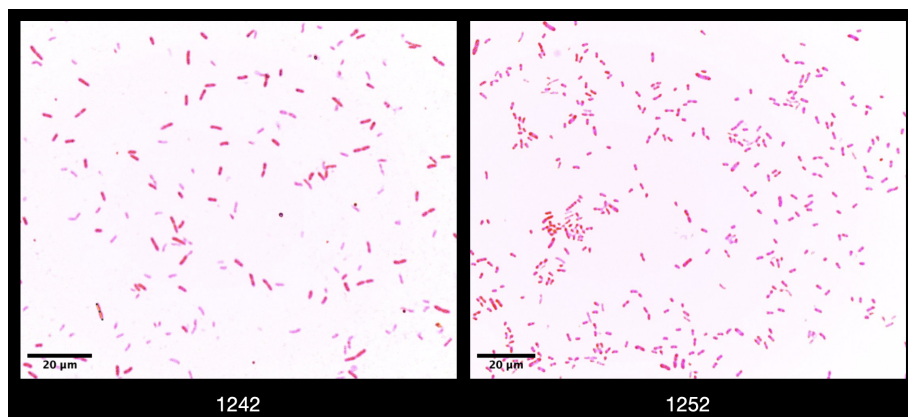


Figura 8: Tinciones de Gram. Las bacterias 1242 y 1252 mostraron ser bacilos Gram negativos. Objetivo 100X

Para realizar la identificación por reacciones bioquímicas se determinó si los aislados bacterianos son capaces de fermentar glucosa, lactosa y/o sacarosa al sembrarlos en agar triple azúcar hierro (TSI) y en el Agar Hierro de Remel Kligler (KIA), los resultados representativos de tres aislados se observan en la Figura 9. En la parte A se muestra, el resultado de los aislados 1232 y 1236 en donde se aprecia un color rojo en el agar inclinado y en la base del tubo no se observa cambio lo que indica que se trata de un microorganismo no fermentador. Este comportamiento es típico de *Pseudomonas* [90], cabe resaltar que casi todos los aislados tuvieron un resultado negativo para esta prueba similar al del aislado 1232. El resultado de esta prueba para el aislado 1236 es una reacción alcalina (color rojo en el agar inclinado) sobre ácida (color amarillo en la base del tubo) indica que el organismo es capaz de fermentar la glucosa, mientras el resultado del aislado

1251 muestra una reacción ácida sobre ácida por el color amarillo tanto en agar inclinado como en la base del tubo por lo que se trata de una bacteria que fermenta glucosa, dextrosa y/o sacarosa.

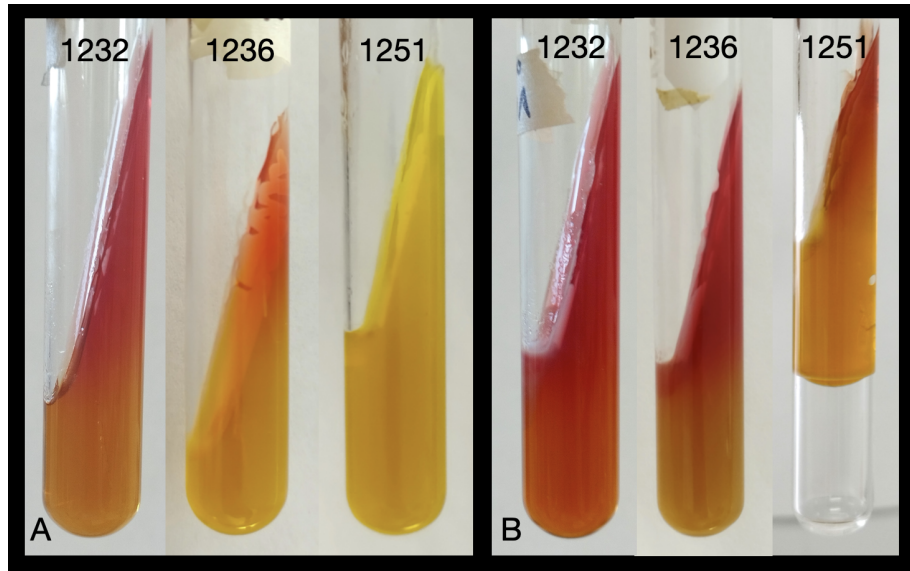


Figura 9: Pruebas TSI (A) y KIA (B) en los aislados bacterianos. Posterior a 24 h de incubación a 28 °C se determinó el resultado de la reacción, color amarillo en la base “ácido, fermenta”, rojo “alcalino, no fermenta”. Si la base del tubo se torna amarilla (ácido) y el pico de flauta se torna roja (alcalina) indica que el organismo fermenta solo la glucosa, si tanto la base del tubo como el pico se tornan amarillos el organismo fermenta glucosa y lactosa. En la prueba KIA además se observó una reacción positiva para la producción de gas.

Para la prueba de KIA una reacción negativa para fermentación de carbohidratos se observa rojo en el agar inclinado (alcalino) y rojo en la base del tubo (alcalino), fue el resultado obtenido para el aislado 1232, por lo tanto, se trata de una bacteria no fermentadora. Esto coincide con la prueba de TSI la mayoría de los aislados resultaron no fermentadores, por lo que, se trata de bacilos Gram negativos del género *Pseudomonas* (Figura 9, panel B). En el segundo tubo observamos el resultado para 1236 donde se aprecia una reacción alcalina (agar inclinado rojo) sobre ácida (base del tubo amarilla) lo que indica que este aislado puede fermentar glucosa pero no lactosa, mientras que en el tercer

5.2. IDENTIFICACIÓN DE LA COLECCIÓN DE BACTERIAS POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

tubo se aprecia el resultado para el aislado 1251 donde tanto la base del tubo como el agar inclinado se observa amarillo (reacción ácida sobre ácida) con producción de gas lo que indica que se trata de una bacteria capaz de fermentar glucosa y lactosa, presumiblemente se trata de *Enterobacter aerogenes* o *Klebsiella oxytoca* [90].

En cuanto a la prueba del uso del citrato como única fuente de carbono todas las bacterias tuvieron un resultado positivo al igual que el aislado 1240 (Figura 10), así como en la prueba de la descarboxilación de la lisina donde todos los aislados, incluido el 1238, resultaron positivos, en contraste con la prueba de la hidrólisis de la urea donde todos los aislados tuvieron un resultado negativo como el aislado 1244. En el caso de la prueba del metabolismo del citrato se conoce que todas las especies de *Pseudomonas* que han sido estudiadas presentan las reacciones clásicas de los ácidos tricarboxílicos [76]. El cambio de color en esta prueba indica que los aislados bacterianos utilizados en esta investigación poseen citrato permeasa que convierte el citrato en oxalacetato y piruvato. Este último en presencia de un medio alcalino genera ácidos orgánicos que son utilizados como fuente de carbono y el medio produce una coloración azul.

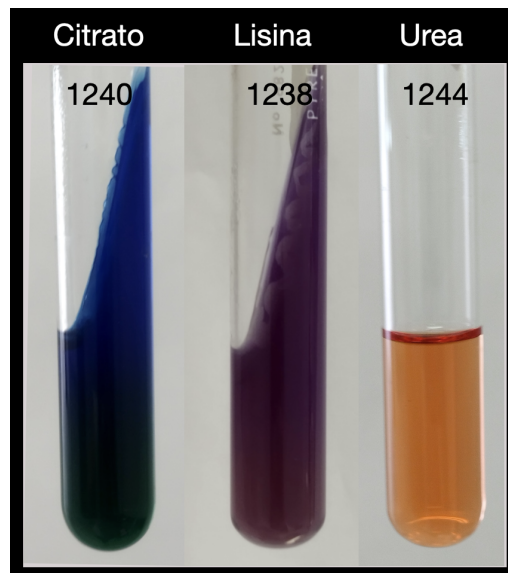


Figura 10: Pruebas bioquímicas, en el primer tubo de ensayo se muestra el resultado para la prueba de Agar citrato de Simmons, en el segundo tubo se observa el resultado de la prueba de descarboxilación de la lisina y en el último tubo el de la hidrólisis de la urea.

Respecto a la hidrólisis de la urea la mayoría de las *Pseudomonas* son negativas en esta prueba [91], como en este caso que ninguno de los aislados produjo una reacción positiva (color rosa mexicano). Por otro lado, en las *Pseudomonas* el catabolismo de la lisina puede producirse por al menos tres vías diferentes que finalizan con la obtención de glutarato que genera acetil-CoA. Estas vías se denominan la vía de la oxigenasa, la de pipercolato y la de cadaverina [76], por lo que la prueba de la lisina positiva indica que se trata de bacterias capaces de metabolizar la lisina en cadaverina (Figura 10).

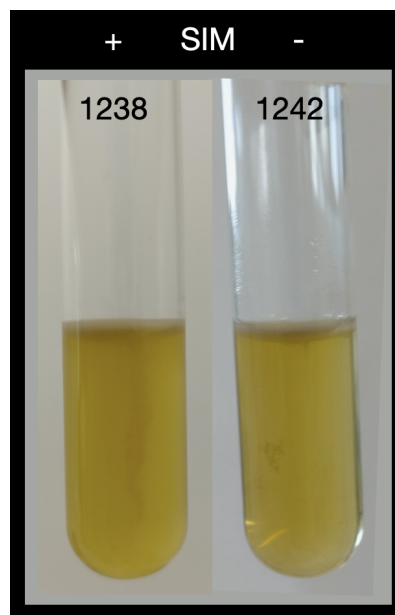


Figura 11: Prueba de motilidad en los aislados bacterianos. En el lado izquierdo se observa un resultado positivo para esta prueba, mientras que del lado derecho se presenta un resultado negativo.

En cuanto a la capacidad de movimiento, ésta se analizó en el medio SIM, el aislado 1238 mostró un resultado positivo para esta prueba, como casi todos los demás aislados con excepción de los aislados 1244, 1251 y 1242 (Figura 11). En la Tabla 3 se presenta el compendio de los resultados de las pruebas bioquímicas para todas las bacterias aisladas de cultivos de fresa con los que se trabajó en esta investigación.

Por otro lado, una reacción importante que se analizó fue determinar si los aislados son

5.2. IDENTIFICACIÓN DE LA COLECCIÓN DE BACTERIAS POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Tabla 3: Características bioquímicas de los aislados

Aislado	Fermentación Glucosa	Descarboxilación Lisina	Prueba de motilidad	Hidrólisis Urea	Citrato de Simmons
1228	-	+	+	-	+
1230	-	+	+	-	+
1232	-	+	+	-	+
1234	-	+	+	-	+
1236	+	+	+	-	+
1238	-	+	+	-	+
1240	-	+	+	-	+
1242	+	+	-	-	+
1244	+	+	-	-	+
1251	+	+	-	-	+
1252	-	+	+	-	+

Posterior a 24 h de incubación a 28 °C; + reacciones positivas, - reacciones negativas.

beta-hemolíticos al sembrarlos en agar sangre e incubarlos a 28 °C por 72 h. En la Figura 12 se muestran los resultados, en cada una de las placas se puede observar el control c que en este caso fue la cepa 296 de *Staphylococcus aureus* que produce zonas claras alrededor de la colonia, como se aprecia en la Figura 12 en las placas superiores. Esto se debe a que lisa por completo los eritrocitos lo que se conoce como beta-hemólisis, a diferencia de los doce aislados bacterianos que se emplearon en esta investigación ya que ninguno produjo algún tipo de hemólisis, la alfa-hemólisis produce una decoloración verdosa alrededor de la colonia que produce hemolisina alfa.

En la parte inferior de la imagen 12 se muestran a los aislados en las placas de agar sangre de frente para observar las características morfológicas de las bacterias. Con esta prueba se descarta que alguno de los aislados sea *Pseudomonas aeruginosa* porque para esta especie es característica la beta-hemólisis. Además presentan un brillo metálico y una pigmentación verde-azulada, las colonias de *Pseudomonas stutzeri* en este medio se observan secas arrugadas y de color beige a marrón, mientras que, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas veronii* no tiene una apariencia distintiva al crecer en este tipo de medio [92].

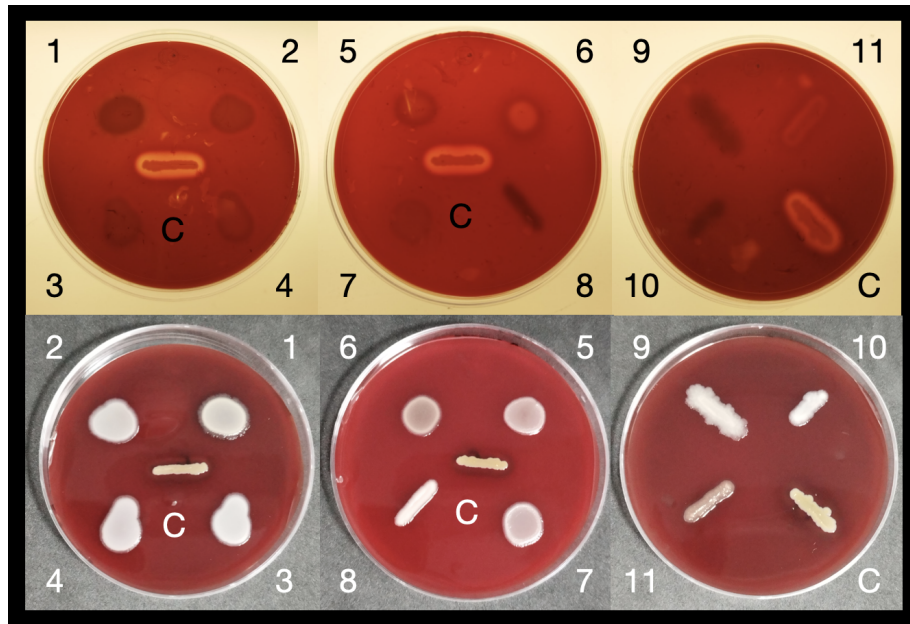


Figura 12: Prueba de hemólisis en los aislados bacterianos en agar sangre. En la parte superior se muestra el reverso de la placa con luz de fondo para observar la hemólisis. En la parte inferior se muestran las placas de frente para mostrar las características morfológicas de los aislados bacterianos. El número corresponde al indicado en la Tabla 2, C, control *S. aureus*. Incubación 28 °C por 72h.

Para la identificación fenotípica de los aislados se tomaron en consideración varias pruebas que se describen en la sección 5.6 y se compararon con los características metabólicas y bioquímicas de las bacterias que resultaron identificadas con el análisis de la secuencia del gen que codifica para la 16S ARNr de los aislados que se detalla en la sección 5.4. En la Tabla 4 se muestran las características de los aislados que pertenecen al género *Pseudomonas* y que se compararon con diferentes especies de dicho género, mientras que, en la Tabla 5 se presentan las características de los dos aislados restantes que pertenecen al género *Klebsiella* y *Variovorax*.

5.2. IDENTIFICACIÓN DE LA COLECCIÓN DE BACTERIAS POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Tabla 4: Caracterización fenotípica de los aislados de *Pseudomonas* spp.

Características	Aislados bacterianos										<i>Pseudomonas</i> spp.			
	1	2	3	4	5	6	7	8	11	A	B	C	D	
Oxidasa	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	ND	
Lipasa	+	-	+	-	+	+	+	-	+	V	ND	-	-	
Hidrólisis gelatina	-	-	-	+	+	+	-	V	-	+	+	-	-	
Hidrólisis almidón	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	ND	+	-	
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	ND	
Arginina dehidrolasa	+	+	+	ND	-	ND	ND	-	-	-	ND	+	+	

Los números corresponden a las bacterias aisladas de cultivos de fresa utilizadas en esta investigación; + reacción positiva, - reacción negativa, V reacción variable, ND no hay datos disponibles. A: *P. lini* [93][94][95]; B: *P. mediterranea* [96]; C: *P. putida* [97]; D: *P. humanensis* [98].

Tabla 5: Características fenotípicas de *Variovorax paradoxus* y *Klebsiella oxytoca*

Características	Aislados bacterianos		Especies blanco	
	9	12	V	K
Oxidasa	+	+	+	-
Catalasa	+	+	+	ND
Indol	-	+	ND	+
Lipasa	+	+	ND	-
Hidrólisis gelatina	-	-	ND	-
Hidrólisis almidón	+	+	ND	ND
Motilidad	-	-	-	-
Arginina dehidrolasa	-	-	-	ND

Los números corresponden a las bacterias aisladas de cultivos de fresa utilizadas en este estudio; + reacción positiva, - reacción negativa, V reacción variable, ND no hay datos disponibles. V: *Variovorax paradoxus*[99][100]; K: *Klebsiella oxytoca*[76][92].

5.3 Identificación mediante sistemas estandarizados API 20 E y API 20 NE

Debido a que el resultado obtenido posterior a realizar las pruebas bioquímicas preparadas en el laboratorio no fue muy claro. Se procedió a realizar la identificación por medio del sistema estandarizado API 20 E que permite identificar bacilos Gram negativos mediante 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas, se realizaron pruebas con este sistema para todos los aislados bacterianos que se utilizaron en la Investigación, esto con la finalidad de dar mayor sustento a nuestra identificación. En la Figura 13, en la parte inferior se muestra la prueba para el aislado 1228 en contraste con un formato base con todas las pruebas positivas en la parte superior. La interpretación de los resultados se realizó con el algoritmo en línea APIweb de bioMérieux, que es capaz de resolver a nivel especie aquellos aislados con resultado de excelente, muy bueno y bueno para identificación del género y especie, mientras que aquellos con baja discriminación se consideraron no identificados (Tabla 6).



Figura 13: Pruebas API 20 E. Parte superior muestra un formato base con las pruebas positivas, parte inferior muestra el resultado de las pruebas para el aislado 1228.

Por otro lado, se realizó la identificación mediante el sistema API 20 NE de cuatro aislados bacterianos de la colección. En la Figura 14, en la parte inferior se observan los resultados para el aislado 1244 y en la Tabla 7 se encuentran los resultados para los cuatro aislados, se consideraron identificados a nivel especie aquellos con calidad de identifica-

5.3. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE SISTEMAS ESTADARIZADOS API 20 E Y API 20 NE71

Tabla 6: Identificación de los aislados bacterianos por medio del sistema API 20 E

Aislado	Identificación API	Identidad %	Calidad
1228	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	76.1	Excelente
1230	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	76.1	Excelente
1232	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	76.1	Excelente
1234	<i>Pseudomonas</i> spp.	53.3	Baja discriminación
1236	<i>Serratia liquefaciens</i>	66.6	Muy buena
1240	<i>Pseudomonas</i> spp.	35.7	No valida
1252	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	72.3	Buena

Los aislados con calidad de identificación excelente, muy buena y buena se consideraron identificados a nivel especie.



Figura 14: Pruebas API 20 NE. En la parte superior se muestra un formato base con resultados positivos de las pruebas, en la parte inferior se muestran los resultados para el aislado 1244.

ción buena. Mediante el uso de este sistema no fue posible identificar tres de los aislados bacterianos utilizados en este estudio, el 1234, 1240 y 1238, incluso cuando este último fue probado mediante ambos sistemas. Esto se debe potencialmente a que estas bacterias aisladas de cultivos de fresa no se encuentran en la base de datos de estos sistemas de identificación. Fue por ello que se optó por utilizar secuenciación del marcador molecular 16S.

Tabla 7: Identificación de los aislados bacterianos por medio del sistema API 20 NE

Aislado	Identificación API	Identidad %	Calidad
1238	<i>Burkholderia</i> spp.	82.4	Baja discriminación
1242	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	95.7	Buena
1244	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	90.6	Buena
1251	<i>Aeromonas hydrophila/cavia</i>	99.2	Muy buena

Los aislados con calidad de identificación muy buena y buena se consideraron identificados a nivel especie.

5.4 Identificación molecular

Los métodos de caracterización morfológica y bioquímica son una alternativa y complementan la identificación fenotípica. En bacterias, el análisis de la secuencia del gen 16S del ARN ribosómico es una herramienta ampliamente utilizada para la identificación molecular [101]. Varias características de los ARNr los convierten en un objetivo útil para la identificación bacteriana. Es de las macromoléculas más conservadas y están presentes en todas las células bacterianas. Por ello, son un marcador molecular. Otra característica es que su función se ha mantenido constante en un periodo de tiempo amplio además el gen 16S ARNr es lo suficientemente grande, de aproximadamente 1500 pb, como para contener información relevante por lo que incluso Woese lo llamó el “cronómetro molecular definitivo” [102]. Este gen tiene regiones conservadas y variables que cambian con el tiempo, las 10 zonas conservadas son útiles para diseñar cebadores que permitan la amplificación de regiones hipervariables, mientras que las nueve regiones variables proporcionan la información más útil para los estudios de taxonomía y filogenia [103].

Con el objetivo de realizar la identificación de la colección de aislados utilizados, procedimos a trabajar a nivel molecular. Para ello utilizamos algunas secuencias previamente generadas para 9 de las bacterias [61], mientras que, para los dos aislados restantes, 1251 y 1252, se realizó la amplificación de una parte del gen 16S ARNr que genera un fragmento de 1465 pb, en la Figura 15 se observa el producto de PCR en gel de agarosa al 1 % con el amplicón 16S ARNr. Con las secuencias obtenidas se realizó un rastreo en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante análisis Blast (Tabla 8). A pesar de que el uso del gen 16S como marcador filogenético tiene sus limitaciones, por ejemplo, la redundancia genética intra genómica, existen diversas razones por las cuales se utiliza la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S para la tipificación molecular, porque, actualmente es relativamente fácil de secuenciar. Además, se dispone de mucha información dentro de las bases de datos que se encuentran en constante expansión [103].

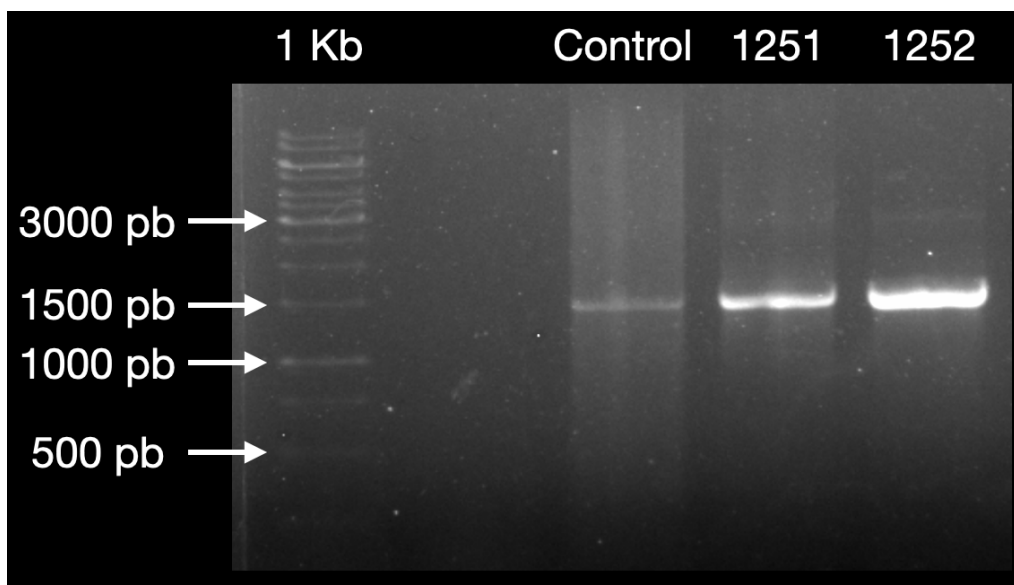


Figura 15: Amplificación del gen 16S ARNr de los aislados bacterianos 1251 y 1252. Gel de agarosa al 1 % Bromuro de etidio, se utilizó un marcador de peso molecular 1 Kb.

Como se aprecia en la Tabla 8, la mayoría de los aislados pertenecen al género *Pseudomonas* que dentro de la familia Pseudomonadaceae es el más complejo con 342 especies con nombres válidos excluyendo sinónimos según en LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature). Este número se encuentra en constante evolución pues en el 2021 el género *Pseudomonas* contenía 259 nombres válidos de especies, desde las primeras descripciones de la especie varios análisis han actualizado su taxonomía basándose en el análisis de la secuencia 16S ARNr [104]. Se han realizado investigaciones comparando la idoneidad de la secuenciación parcial del gen 16S ARNr para la identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores contra sistemas de identificación fenotípica comerciales como API 20 NE y encontraron que la secuenciación de dicho gen es más precisa para la identificación de este tipo de bacterias, con 92 % de los aislados asignados a nivel de especie en comparación con 54 % con el sistema API [101]. Sus resultados concuerdan con los de esta Investigación, porque, solo siete de los 11 aislados bacterianos fueron identificados a nivel especie mediante los sistemas API 20E y 20NE. Además, algunos de los aislados fueron identificados en especies diferentes a las de la obtenidas

Tabla 8: Identificación molecular de los aislados bacterianos con el marcador filogenético 16S ARNr

Aislado	Especie	% Identidad
1228	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	99.93
1230	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	99.93
1232	<i>Pseudomonas putida</i>	99.93
1234	<i>Pseudomonas lini</i>	100
1236	<i>Pseudomonas lini</i>	99.78
1238	<i>Pseudomonas putida</i>	99.71
1240	<i>Pseudomonas lini</i>	96.88
1242	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	99.78
1244	<i>Variovorax paradoxus</i>	100
1251	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99.63
1252	<i>Pseudomonas putida</i>	99

mediante secuenciación, esto se debe en parte a que las bases de datos disponibles de los sistemas de identificación fenotípica son limitadas y no contienen las especies de *P. hunanensis*, *P. lini*, *P. mediterranea* ni a *Variovorax paradoxus*, por lo que, resulta imposible identificar estas especies mediante las pruebas API.

Cabe resaltar que un enfoque que ha demostrado ser una herramienta confiable para la identificación de cepas a nivel de especie es el análisis molecular utilizando cuatro genes de expresión constitutiva (*gyrB*, *rpoB*, *rpoD* y 16S ARNr) que ha permitido la clarificación de la filogenia en *Pseudomonas* al mejorar la delimitación de especie [104], por lo que resultaría útil utilizar dicho enfoque en una investigación ulterior.

5.5 Filogenia de los aislados bacterianos

Por otra parte, para el análisis de las relaciones filogenéticas entre los aislados bacterianos empleados en esta investigación se realizó un árbol filogenético exploratorio con especies representativas del género *Pseudomonas*. En la Figura 16, se observa el árbol construido con el método de Máxima parsimonia en el programa SeaView [105]. Las ramas de color rojo indican la ubicación de los aislados bacterianos utilizados en esta investigación. Además, se observa que el aislado 1252 pertenece a la especie *Pseudomonas putida*. Este resultado coincide con la búsqueda Blast, a diferencia del aislado 1242 que pertenece a la especie *Pseudomonas mediterranea*.

Los aislados restantes que fueron identificados dentro del género *Pseudomonas* se agrupan fuera del árbol, esto se debe a que como ya se mencionó anteriormente este es uno de los géneros de bacterias más complejos y las especies identificadas por Blast se encuentran dentro de otro grupo de la misma especie, esto solo refleja la enorme diversidad genética de este género que se encuentra en constante expansión debido a la nueva información genética disponible gracias a la secuenciación.

En el 2021 Girard y colaboradores realizaron una actualización de la filogenia de *Pseudomonas* mediante el uso de una combinación de datos de secuenciación de genoma completo y del gen *rpoD*, utilizaron 316 cepas y 313 especies tipo de *Pseudomonas* que revelaron 16 grupos dentro del género y una partición del grupo *P. putida* en 15 subgrupos [104]. Las especies de bacterias en esta investigación pertenecen a diferentes subgrupos dentro de dicha clasificación, así tenemos que *P. lini* pertenece al subgrupo de *P. mandelii*, mientras que *P. mediterranea* pertenece al subgrupo de *P. corrugata* y *P. hunanensis* al subgrupo de *P. vlassakiae* y *P. putida* pertenece al subgrupo de *P. putida* dentro los 15 subgrupos que conforman este grupo. Se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI de las secuencias para el gen 16S ARNr de cada una de las especies dentro de cada uno de los grupos y con estas se realizó un árbol filogenético para cada subgrupo

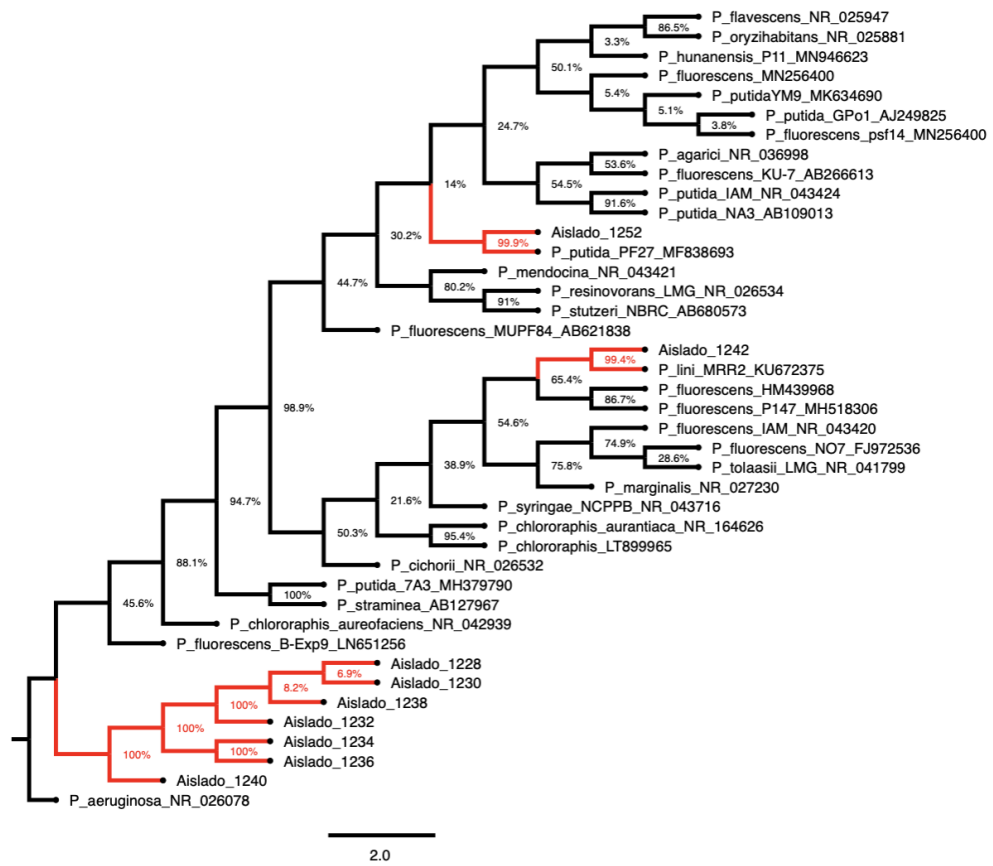


Figura 16: Relaciones filogenéticas de los aislados de *Pseudomonas* spp. por el método de Máxima Parsimonia.

a excepción del subgrupo de *P. humanensis*, ya que, dicho subgrupo sólo se encuentra conformado por tres especies y la cepa aún carece de estatus taxonómico.

En la Figura 17, se muestran las relaciones filogenéticas para el subgrupo de *P. mandelii* donde según la clasificación antes mencionada pertenece la especie *P. lini*, la historia evolutiva de este subgrupo fue inferida utilizando el método de Máximo Likelihood con el modelo Kimura 2-parámetros en el programa MEGA, como se observa los aislados 1234, 1236 y 1240 (recuadro rojo) pertenecen a la especie *Pseudomonas lini*, en concordancia con la búsqueda Blast y las características fenotípicas de estas bacterias.

Por otro lado, en la Figura 18 se encuentra el árbol que muestra las relaciones filogenéticas del aislado 1242 que reveló se trata de una *P. mediterranea* dentro del subgrupo de las *P. corrugata*, en concordancia con el Blast. Así mismo, en la Figura 19, se muestra la reconstrucción filogenética de los aislados de *Pseudomonas putida* 1232, 1238 y 1252 por el método de Máxima parsimonia en donde se puede observar el subgrupo de *P. putida* y que los aislados efectivamente corresponden a especies del mismo.

Para los aislados 1244 y 1251 que el análisis fenotípico y la búsqueda Blast reveló que no pertenecen al género *Pseudomonas* se realizó un árbol filogenético para cada uno, para el aislado 1242, *Variovorax paradoxus* se muestra en la Figura 20 y fue realizado utilizando las secuencias para el gen 16S ARNr de seis diferentes especies dentro del género *Variovorax* [99] por el método de Neighbor Joining como grupo externo se utilizó la secuencia de *P. aeruginosa*. Para el aislado 1251, *Klebsiella oxytoca* el análisis filogenético de las secuencias para el gen 16S ARNr por el método de Máxima parsimonia, se presenta en la Figura 21, se utilizaron siete secuencias de diferentes especies dentro del género *Klebsiella* [106] y como grupo externo se utilizó la secuencia del gen 16S ARNr de *Kluyvera cryogenensis*.

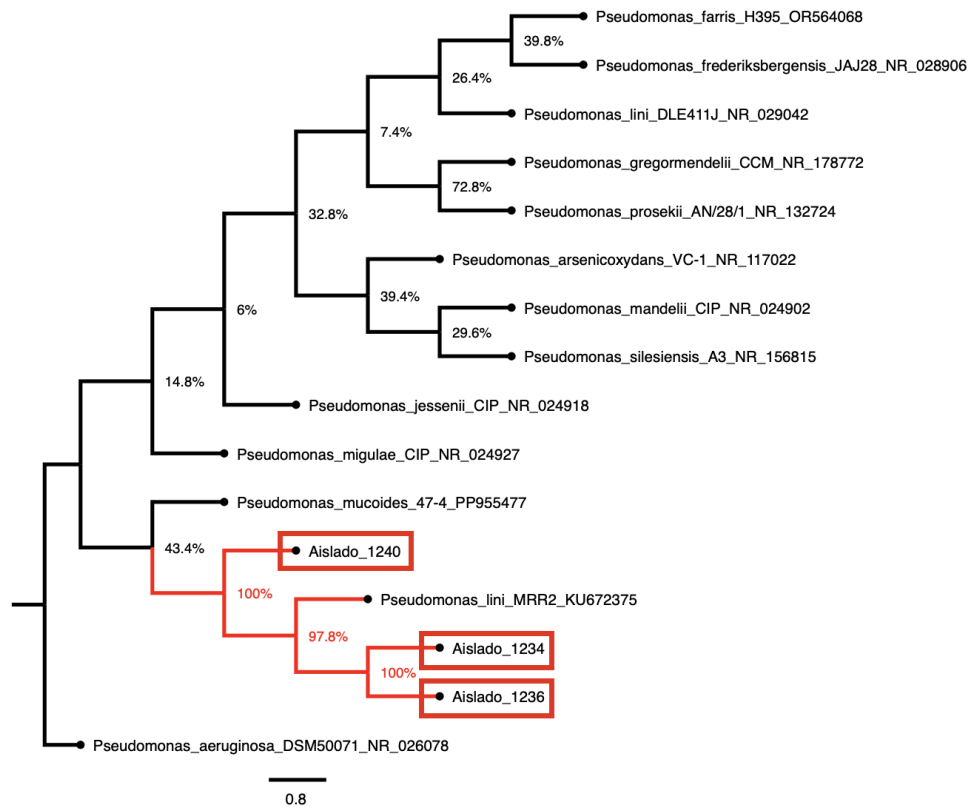


Figura 17: Árbol filogenético de las *Pseudomonas lini* por el método Maximum Likelihood del subgrupo de *P. mandelii*.

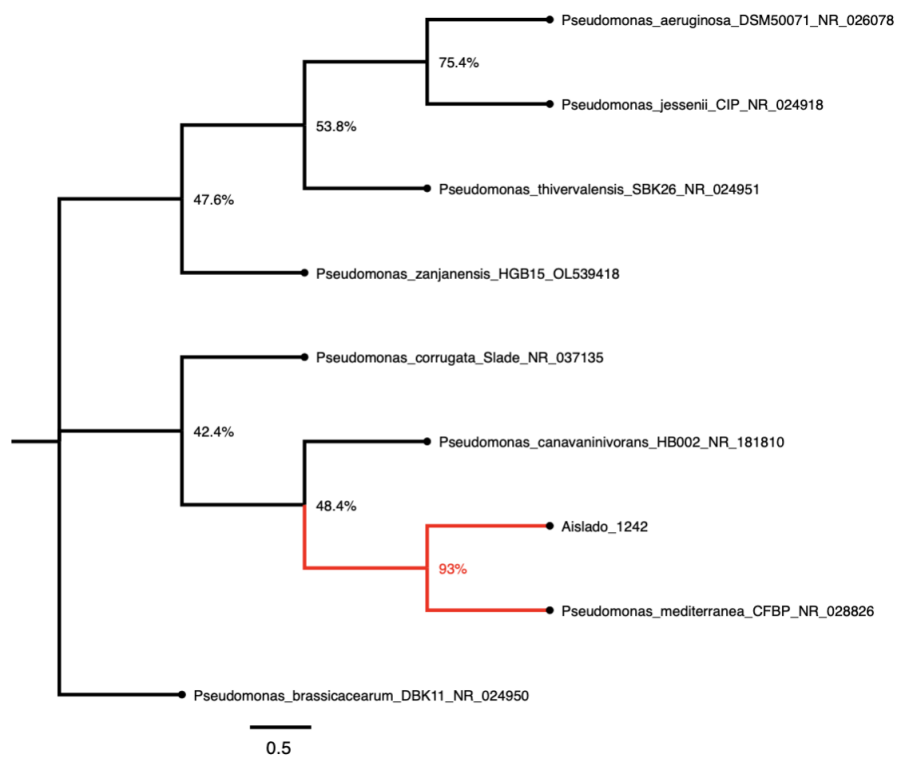


Figura 18: Relaciones filogenéticas del aislado de *Pseudomonas mediterranea* 1242 por medio del método Máxima parsimonia.

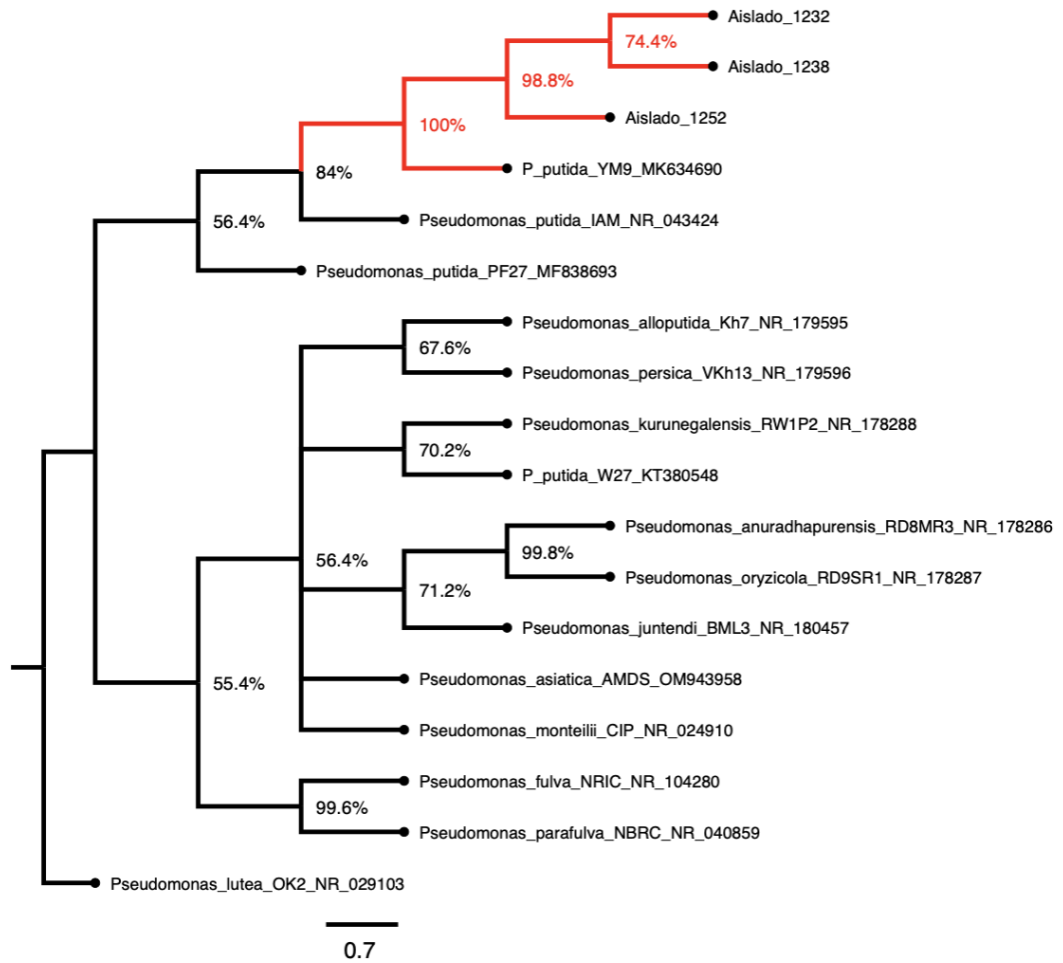


Figura 19: Árbol filogenético del subgrupo de *Pseudomonas putida* por el método de Máxima parsimonia donde se incluyen a las bacterias 1232, 1238 y 1252.

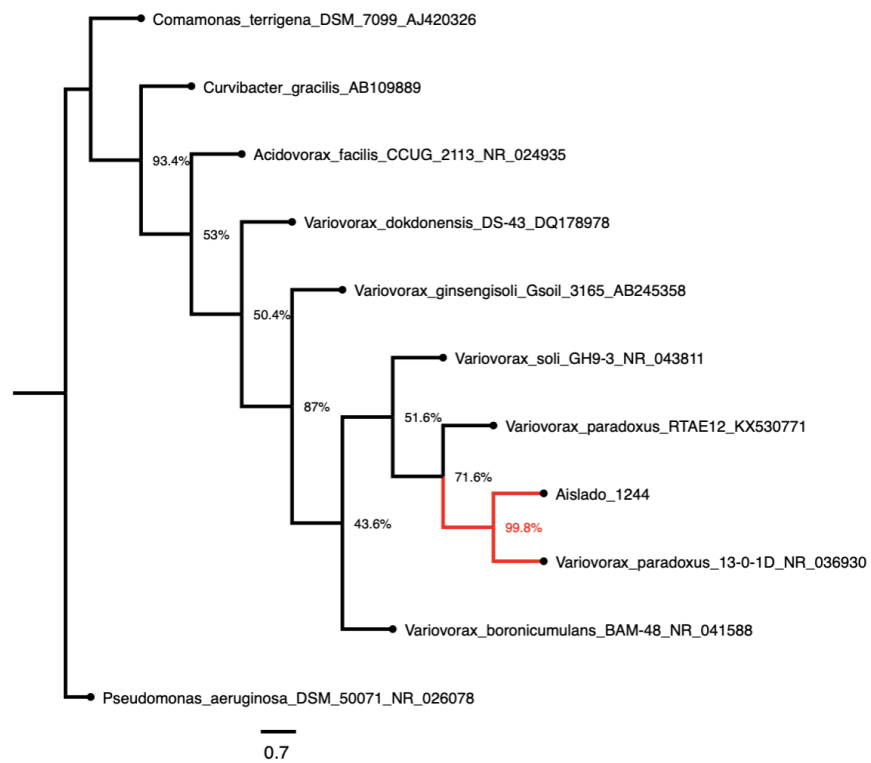


Figura 20: Reconstrucción filogenética de las secuencias 16S ARNr de *Variovorax paradoxus* por el método de Neighbor Joining

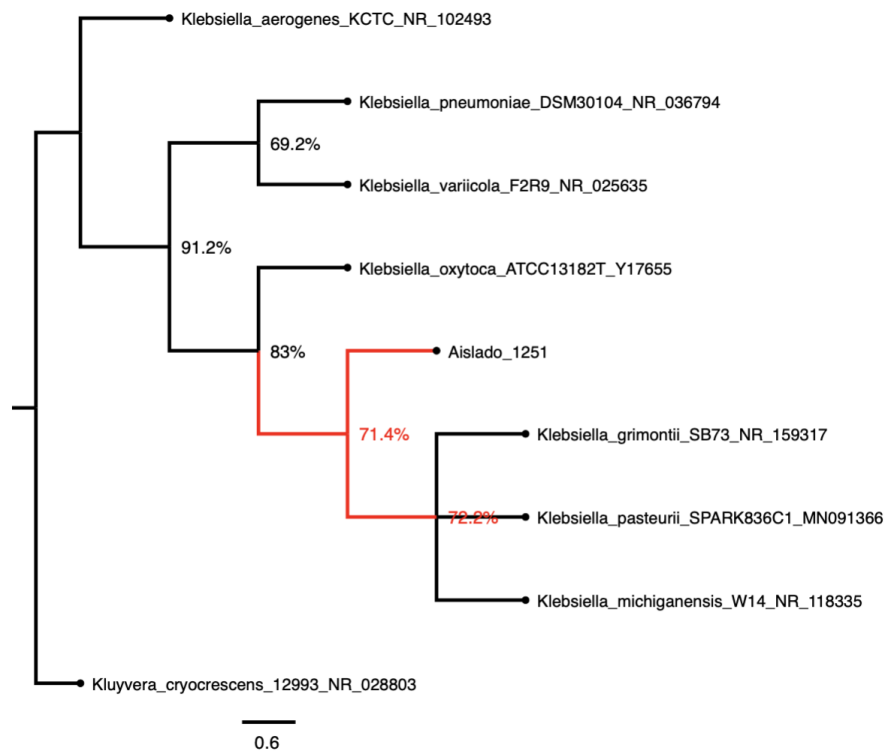


Figura 21: Análisis comparativo de las secuencias 16S ARNr de *Klebsiella oxytoca* por el método de Maximun likelihood.

5.6 Construcción de consorcios microbianos

Los consorcios microbianos son comunidades artificiales de microorganismos de diferentes especies que interaccionan entre sí, compartiendo nutrientes y metabolitos, así como moléculas de señalización que les permiten mantener una comunicación constante, cooperando para la realización de múltiples tareas y alimentándose de manera cruzada, que han sido utilizados con fines biotecnológicos como biofertilizantes y agentes de biocontrol de fitopatógenos [20]. Para la formulación de éstos se determinó el perfil promotor del crecimiento vegetal de cada uno de los aislados por medio de diferentes pruebas que incluyen: la solubilización de fosfatos, producción de pigmentos y enzimas hidrolíticas, así como la secreción de polisacáridos, síntesis ácido indol acético y ácido cianhídrico. Una vez analizado que son candidatos para funcionar como promotores de crecimiento en planta, se determinó la compatibilidad entre los aislados.

5.6.1. Perfil promotor del crecimiento de las plantas y antagonista de los aislados bacterianos

Solubilización de fosfatos

En cuanto a la solubilización de fosfatos todos los aislados resultaron positivos para esta prueba como se observa en la Figura 22 donde los números corresponden con el aislado según la Tabla 9, como control positivo se utilizó la cepa 1316 previamente identificada como positiva para esta prueba. En la imagen 22 se aprecia que no todos los aislados solubilizan fosfatos con la misma intensidad ya que algunos muestran halos más grandes, el índice de solubilización de fosfatos (ISF) se obtuvo que los aislados con mayores índices de solubilización fueron el 1232 con 1.65, el 1251 con 1.6, el 1244 con 1.57 y el 1236 con 1.54, mientras que los aislados con menores ISF fueron el 1228 con 1.25 y el 1234 con 1.29, (Tabla 9). El principal nutriente que limita el desarrollo de las plantas es el fósforo, ya que a pesar de ser uno de los más abundantes en el suelo está presente en

forma insoluble [67]. En la actualidad ha cobrado mayor interés las investigaciones sobre el uso de los microorganismos que solubilizan fosfatos en la producción de cultivos como un método alternativo para satisfacer la demanda de fósforo en los mismos, los estudios sugieren que la aplicación de PGPR que solubilizan fosfatos tienen el potencial de reducir hasta en 50 % la aplicación de P químico [49]. Es por esta razón que la solubilización de fosfatos es uno de los principales mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas que tienen las bacterias y nuestros resultados concuerdan con los de otros autores sobre la capacidad de las bacterias del género *Pseudomonas* y *Klebsiella* para solubilizar fosfatos [43], los aislados con mayores ISF se utilizaron para formar los consorcios para observar su efecto en planta de jitomate.

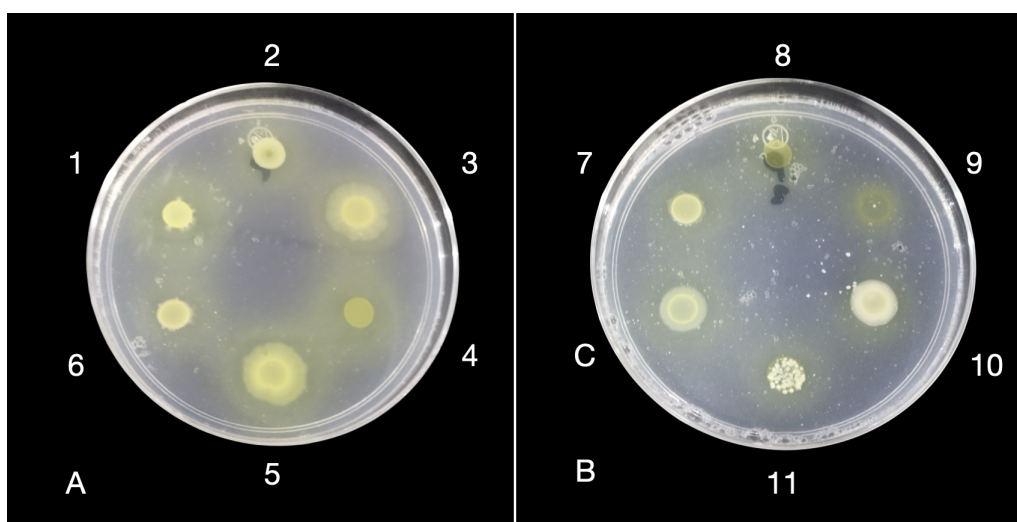


Figura 22: Ensayo de solubilización de fosfato inorgánico de los aislados en placas de Agar Pikovskaya incubadas a 28 °C por tres días. La prueba se realizó por triplicado.

Producción de exopolisacáridos

En este ensayo se determinó que todos los aislados producen polisacáridos extracelulares en diferentes concentraciones expresadas en mg/g de peso seco. En la Figura 23, se observa una de las réplicas del experimento de producción de exopolisacáridos del aislado 1240, las partículas que se aprecian en el fondo del matraz son los exopolisacáridos antes

de la filtración, para la prueba se utilizó como control la cepa 269 de *Escherichia coli*. Los aislados productores de polisacáridos se dividieron en productores de alto contenido de exopolisacáridos 1228, 1230, 1234, 1240, 1242 y 1251, mientras que los restantes se consideraron productores moderados de exopolisacáridos, el aislado con menor producción fue el 1232 con un promedio de 8 mg/g de peso seco. En la Figura 24, se muestra la producción de exopolisacáridos de cada uno de los aislados, sólo tres de los aislados 1230, 1240 y 1242 presentan diferencias estadísticas significativas respecto del control que en este caso se utilizó una cepa de *E. coli*. La producción de polisacáridos extracelulares por cepas bacterianas ha sido implicada en los procesos de colonización que les confieren ventajas selectivas sobre otros microorganismos asociados a las raíces de las plantas en lo que respecta a la nodulación, colonización endofítica y supervivencia, además disminuyen el estrés salino ya que los polisacáridos extracelulares se unen a iones Na^+ disminuyendo su concentración en la zona de la raíz [67].

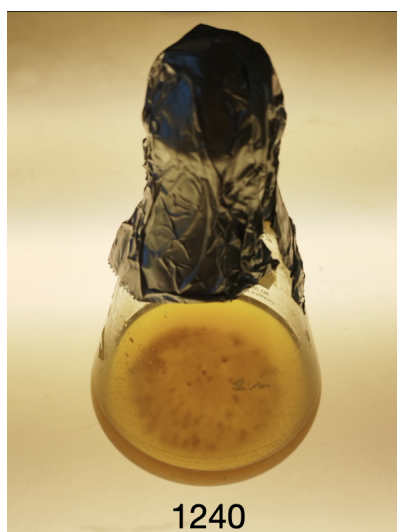


Figura 23: Producción de exopolisacáridos en el aislado 1240. Los polisacáridos extracelulares se precipitaron con acetona a 4 °C durante 6 días.

Los aislados 1240, 1242 y 1251 que fueron clasificados como productores de alto contenido de polisacáridos extracelulares se utilizaron en la formulación de los consorcios, el aislado 1230 que a pesar de ser el mayor productor de polisacáridos extracelulares no

fue utilizado debido a su incompatibilidad con otras cepas como se muestra en la sección 5.6.2. En la Tabla 9, se encuentra el compendio de los resultados sobre la producción de polisacáridos extracelulares.

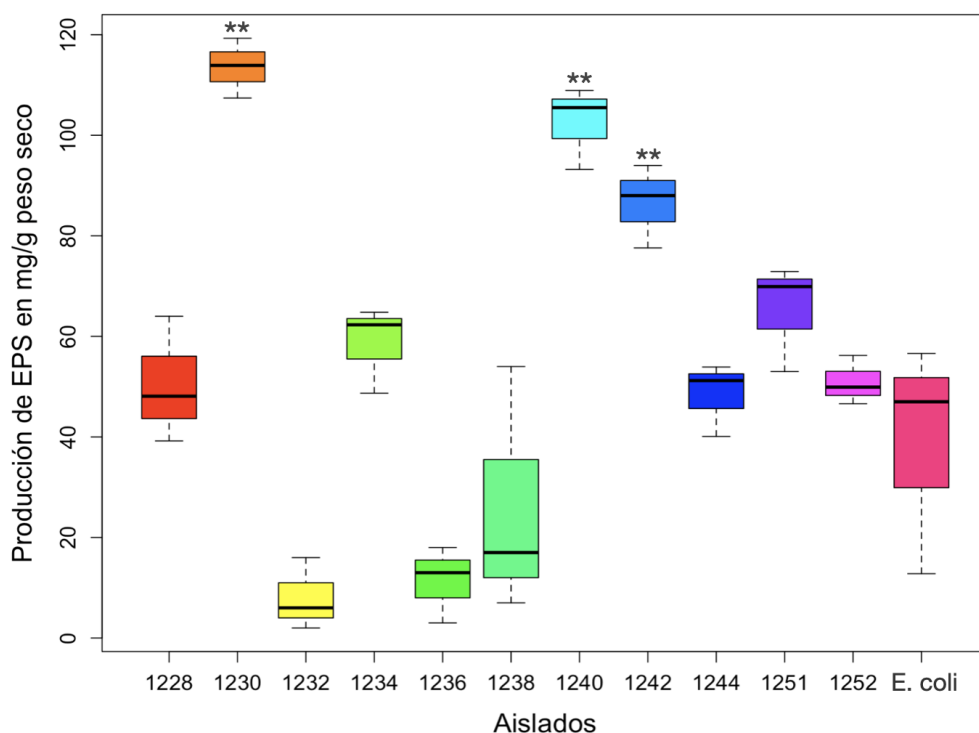


Figura 24: Producción de exopolisacáridos por los aislados bacterianos. Los elementos del diagrama son límites de la caja: cuartiles superior e inferior, línea gruesa: mediana, línea punteada: valor mínimo y máximo. ** diferencias estadísticas significativas respecto del control según la prueba de Tukey $p < 0,005$.

Producción AIA

La prueba de síntesis de indol se realizó tres veces, pero solo uno de los aislados obtuvo una reacción positiva en las 3 pruebas el aislado 1251 que pertenece al género *Klebsiella* (Figura 25, Tabla 9), mientras que los resultados para el aislado de *Pseudomonas putida* 1252 presentó resultados variables, ya que, en una de las pruebas tuvo una reacción positiva, para esta prueba se utilizó como control positivo la cepa 269 de *E. coli* y como control negativo la cepa 693 de *Salmonella*. Los aislados 1251 y 1252 ambos

fueron utilizados en la formulación de los consorcios ya que producen la principal auxina que estimula el crecimiento de las plantas.

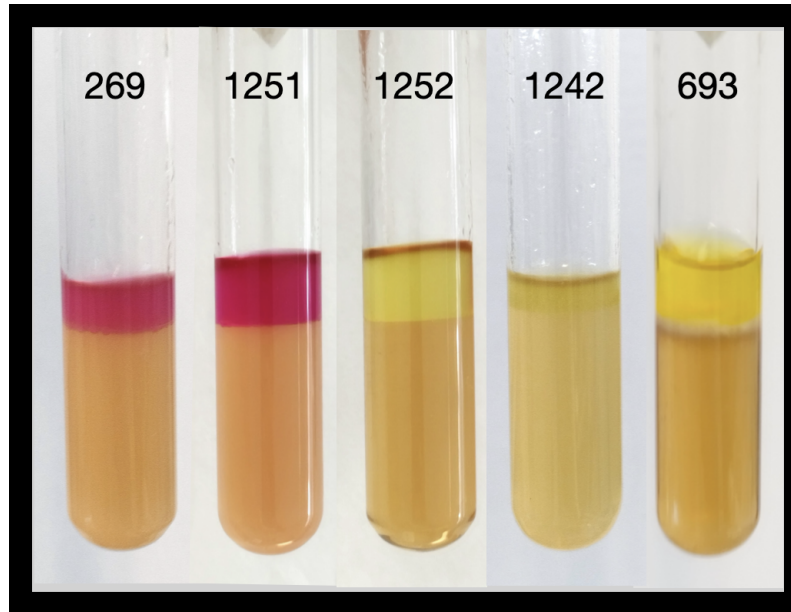


Figura 25: Ensayo de la producción de AIA en los aislados. Los aislados en CN suplementado con triptófano incubados por 24 h a 28 °C, las reacciones positivas se observan en los dos primeros tubos de ensayo.

La capacidad para producir el ácido indol acético (AIA) es el mecanismo más utilizado para explicar los efectos positivos de las PGPR en el crecimiento de las plantas, ya que esta hormona es la auxina más común, se estima que es producida por el 80 % de las PGPR y tiene diversos efectos en las plantas que incluyen: estimular la germinación de tubérculos y semillas, mejorar la tasa de desarrollo del xilema y de las raíces, regular la diferenciación y división celular, así como la respuestas a la gravedad y la luz, la biosíntesis de metabolitos e iniciar la formación de raíces laterales [14]. Cabe resaltar que diferentes plantas son sensibles a diferentes niveles de auxina y esto también depende de la especie y edad de la planta, además de que, la concentración de auxina sintetizada por la planta determina su efecto en la estimulación o inhibición del crecimiento [54]. Sin embargo, algunas PGPR no solo son capaces de sintetizar AIA, sino que también pueden degradarlo, por ejemplo en el caso de *P. putida* 1290 que es capaz de crecer en AIA como

única fuente de carbono, nitrógeno y energía lo que le permite manipular los niveles de esta hormona e inducir cambios fisiológicos en la planta, además el controlar los niveles de AIA posiblemente pueda optimizar su nicho ecológico al mejorar el crecimiento de la planta al producir auxina si los niveles son subóptimos o excluir patógenos al degradar esta hormona producida en exceso por el mismo patógeno [16].

Ácido cianhídrico HCN

Para determinar la producción del compuesto volátil HCN los aislados fueron sembrados en AN suplementado con glicina, cinco de los aislados no produjeron HCN ya que el papel filtro saturado con una solución de ácido pícrico al 2.5 % y carbonato de sodio Na_2CO_3 al 12.5 %, que en una reacción positiva debe de virar al color naranja o rojo, éste quedó de color amarillo como se muestra en la Figura 26 donde se observa el aislado 1230 con un resultado negativo para esta prueba, otros aislados negativos fueron el 1228, 1232, 1236 y 1238. Los aislados que produjeron HCN fueron divididos en productores fuertes en donde el papel filtro cambio de color a rojo como el aislado 1252 que se observa en la imagen además de los aislados 1242 y 1244, y los productores moderados que presentaron un cambio de color del papel filtro a naranja como el aislado 1251 que se muestra al centro de la imagen además de los aislados 1234 y 1240. El compendio de los resultados se encuentra en la Tabla 9.

El ácido cianhídrico (HCN) es un metabolito secundario volátil con actividad antifúngica que es producido por algunas bacterias Gram negativas durante la fase estacionaria, este compuesto volátil es altamente tóxico ya que interrumpe el suministro de energía a la célula al inhibir varias metaloenzimas como la citocromo oxidasa C que interviene en el transporte de electrones en la etapa final de la respiración aeróbica [107]. Diversos géneros de bacterias son capaces de producir HCN entre estos se encuentran *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus* y *Aeromonas* [54], se ha demostrado que *Pseudomonas* productoras de HCN presentan actividad antifúngica contra *S. rolfsii* y *Rhizoctonia solani* [57].

Tabla 9: Características promotoras del crecimiento de las plantas y antagonicas presentes en los aislados.

Número	Aislado	ISF ^a	Exopolisacáridos ^b	AIA ^c	HCN ^d
1	1228	1.25	++	-	-
2	1230	1.34	++	-	-
3	1232	1.65	+	-	-
4	1234	1.29	++	-	+
5	1236	1.54	+	-	-
6	1238	1.35	+	-	-
7	1240	1.35	++	-	+
8	1242	1.29	++	-	++
9	1244	1.57	+	-	++
10	1251	1.6	++	+	+
11	1252	1.43	++	V	++
C	Control	1.48	+	+	-

^a Índice de solubilización de fosfatos; ^b Producción de polisacáridos extracelulares + < 50 mg/g de peso seco, ++ < 50 mg/g de peso seco; ^c Producción de ácido indol acético: reacción positiva +, reacción negativa -, reacción variable V 60 % reacciones positivas;

^d Productores de ácido cianhídrico, ++ altos, + moderados, - no productores.

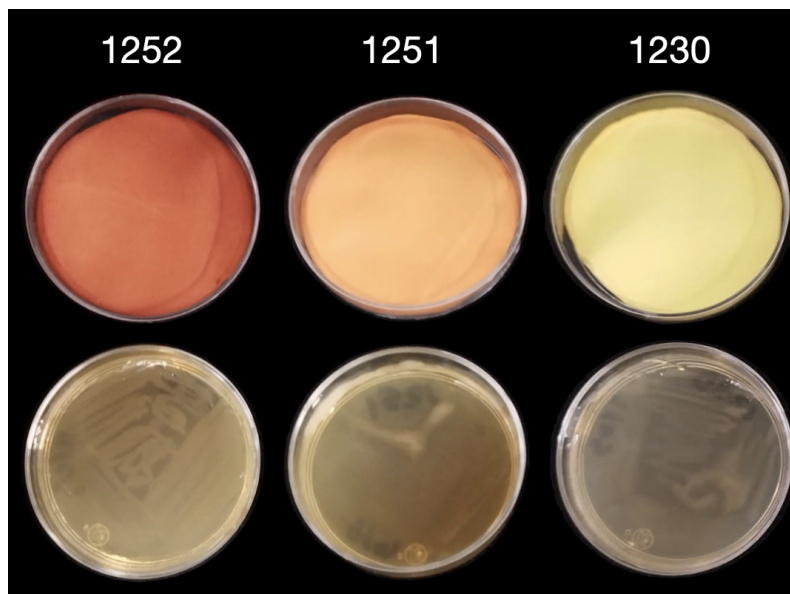


Figura 26: Prueba de producción de HCN. Los aislados fueron clasificados en productores fuertes 1252, productores moderados 1251 y no productores de HCN 1230.

Producción de piocianina y pigmentos de fenazina

Se determinó la capacidad de los aislados de *Pseudomonas* para producir pigmentos de fenazina, como la piocianina, la piorrubina, la clororafina y la oxiclolorafina, las fenazinas son un grupo de pigmentos heterocíclicos de colores brillantes con actividad antibiótica de amplio espectro [28]. El sulfato de potasio que contiene el agar *Pseudomonas* P estimula la producción de piocianina y piorrubina lo que comúnmente se utiliza para el enriquecimiento de las *Pseudomonas fluorescentes*. Se observó que todos los aislados utilizados en esta investigación producen pigmentos e incluso algunos de ellos presentan actividad incrementada. En la Tabla 10, se encuentran los resultados obtenidos en cuanto a la producción de pigmentos, como se observa en la Figura 27 los pigmentos producidos por los aislados de *Pseudomonas* son piorrubina de color rosa a rojo, oxiclolorafina tiñe el medio de color amarillo pálido y clororafina que es muy poco soluble y se acumula como cristales verdes alrededor de la colonia [72]. Todos los aislados que conforman los consorcios producen algún tipo de pigmento por lo que se espera tengan propiedades de biocontrol, ya que la producción de fenazinas de varias cepas de *Pseudomonas* PGPR se

ha relacionado con su capacidad para controlar hongos fitopatógenos [28].

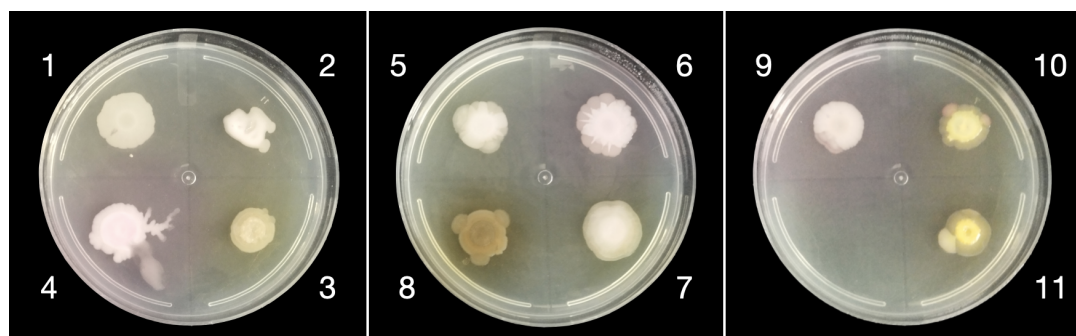


Figura 27: Producción de pigmentos de fenazina en los aislados de *Pseudomonas* spp. Aislados bacterianos: 1-1228, 2-1230, 3-1232, 4-1234, 5-1236, 6-1238, 7-1240, 8-1242, 9-1244, 10-1251, 11-1252.

Producción de pioverdina

Otro de los pigmentos que producen las especies del género *Pseudomonas* es la pioverdina, se utilizó el agar *Pseudomonas* F para verificar la producción de dicho pigmento (Tabla 10) siete de los aislados producen pioverdina que es un pigmento color amarillo verdoso. En la Figura 28, se observa como los aislados 4 y 8 que corresponden al 1234 y 1242 presentan actividad incrementada en cuanto a la producción de pioverdina. Las pioverdinas tienen un papel fisiológico importante porque funcionan como sideróforos eficientes, que son quelantes de hierro con alta afinidad de unión con el ion férrico y se liberan en condiciones de limitación de Fe_{3+} , los sideróforos actúan de varias maneras ya que favorecen el crecimiento de las plantas al aumentar la accesibilidad del hierro ya que pueden reducir el Fe_{3+} a Fe_{2+} el tipo de hierro que utilizan las plantas, además de actuar como transportadores de hierro los sideróforos almacenan hierro intracelular por lo que suprimen el crecimiento de otro microorganismos al limitar su acceso [43]. Cabe destacar que el aislado 1242, 1251 y 1252 que producen pioverdina se encuentran en varios de los consorcios formulados en esta investigación.

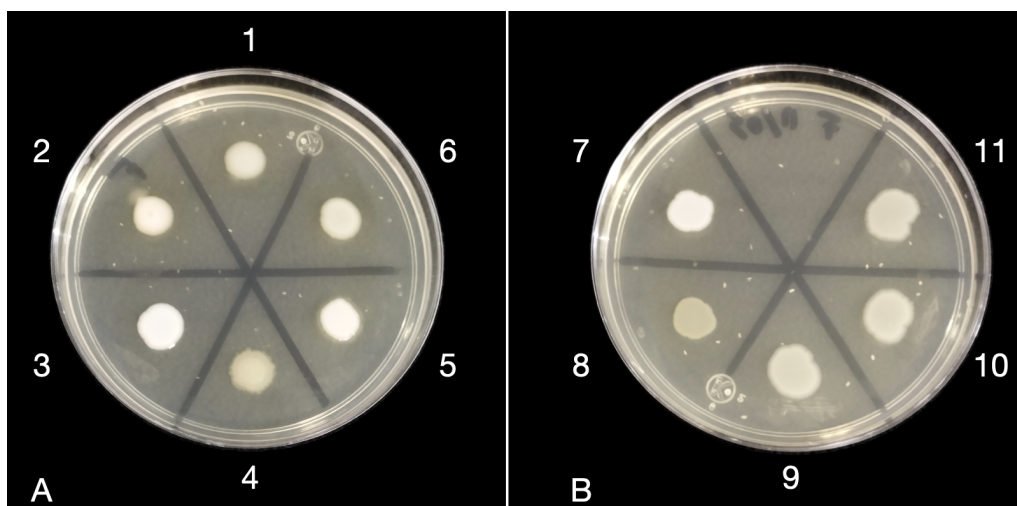


Figura 28: Producción de pioverdina en los aislados bacterianos. Se observan pigmentos de diferentes colores. Aislados bacterianos: 1-1228, 2-1230, 3-1232, 4-1234, 5-1236, 6-1238, 7-1240, 8-1242, 9-1244, 10-1251, 11-1252.

Tabla 10: Producción de pigmentos en los aislados bacterianos

Número	Aislado	Oxíclororafina	Clororafina	Piorrubina	Pioverdina
1	1228	+	-	-	+
2	1230	-	-	+	+
3	1232	-	++	-	-
4	1234	-	-	++	++
5	1236	+	-	-	-
6	1238	-	-	++	+
7	1240	-	+	-	-
8	1242	-	++	-	++
9	1244	-	+	++	-
10	1251	+	-	+	+
11	1252	-	+	-	+

Reacción positiva +, reacción negativa - y reacción incrementada ++.

Producción de quitinasas

Se realizó la prueba semicuantitativa de producción de quitinasas en un medio suplementado con quitina coloidal al 1 % como fuente principal de carbono. Posterior al periodo de incubación, la placa se tiñó con Rojo Congo como reactivo de detección que permite detectar el halo de hidrólisis del sustrato (Figura 29), como control positivo se

utilizó la cepa 1227 que es productora de quitinasas con 1.54 de Actividad Enzimática Relativa (AER) determinada con la fórmula 4.2 [74]. En esta investigación se observó que algunos aislados produjeron quitinasas, sin embargo, no en la misma proporción que se corroboró al calcular su AER donde los aislados con mayores halos de degradación fueron el 1238 y 1236 con una AER de 2.34 y 2.01, respectivamente.

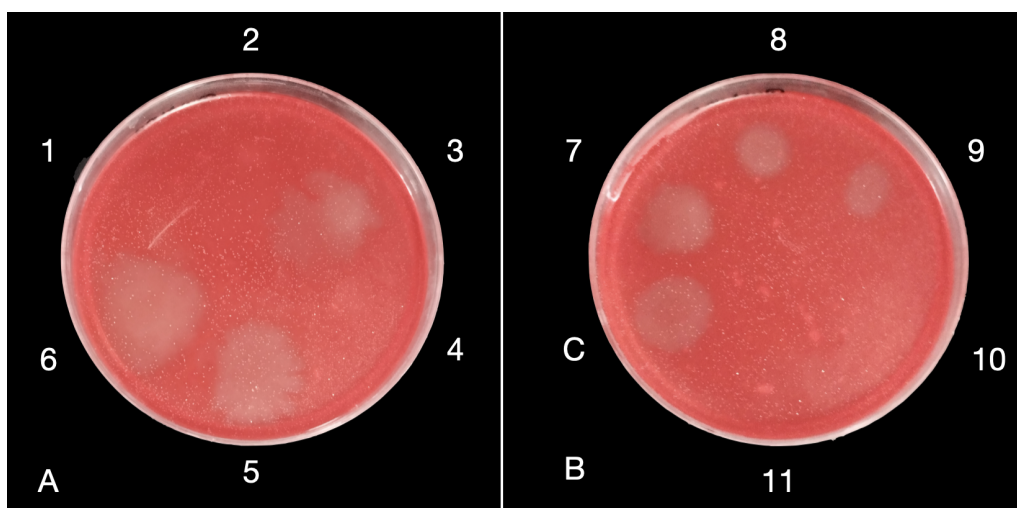


Figura 29: Prueba de la producción de quitinasas, aquellos aislados con actividad quitinolítica se observan con un halo translúcido en donde se encontraba el crecimiento bacteriano. Aislados bacterianos: 1-1228, 2-1230, 3-1232, 4-1234, 5-1236, 6-1238, 7-1240, 8-1242, 9-1244, 10-1251, 11-1252, C-1227.

De los once aislados bacterianos empleados en la investigación, cinco no presentaron actividad quitinolítica, mientras que los aislados que fueron capaces de hidrolizar quitina incluyen: 1232, 1240, 1242 y 1244, en la Tabla 11 se muestra su capacidad para degradar quitina calculada mediante la fórmula AER. Aunque el aislado 1238 presenta una mayor actividad enzimática relativa calculada no se utilizó para formular los consorcios debido a su incompatibilidad con otras cepas, si bien todos los demás aislados con actividad quitinolítica fueron utilizados en la formulación de los consorcios. La producción de enzimas líticas es un mecanismo clave que las PGPR utilizan para combatir fitopatógenos, las quitinasas son proteínas con actividad hidrolítica que degradan quitina un polímero

componente principal de la pared celular de los hongos [54]. Se ha descubierto que las PGPR que producen quitinasas como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia* presenta actividades de biocontrol contra diversos hongo fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium ultimum* [14].

Producción de amilasas

Por otro parte se realizó el ensayo de producción de amilasas, enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos en el almidón lo que facilita la entrada de las bacterias a las raíces de las plantas [59], la prueba se desarrolló en un medio de cultivo suplementado con almidón y los resultados después de agregar el lugol como reactivo de detección (Figura 30), como control positivo se utilizó la cepa 1316 que previamente se conocía es productora de amilasa con AER de 1.78, algunos de los aislados mostraron que son capaces de producir amilasas pero no en la misma proporción como se observa en la Figura 30.

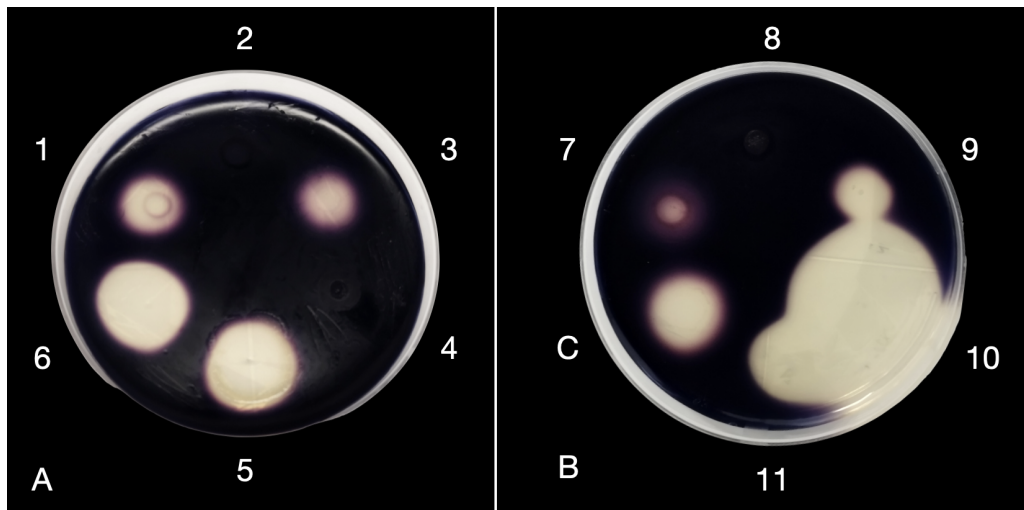


Figura 30: Ensayo de la producción de amilasas. Los aislados productores de amilasas son aquellos que muestran una zona incolora de actividad enzimática alrededor de la colonia. Aislados bacterianos: 1-1228, 2-1230, 3-1232, 4-1234, 5-1236, 6-1238, 7-1240, 8-1242, 9-1244, 10-1251, 11-1252, C-1316.

Al calcular AER medida semicuantitativa de la actividad enzimática de los aislados se observó que el aislado 1251 fue el mayor productor de amilasas con una AER de 3.81, seguido del aislado 1238 y 1244 con 2.61 y 2.45, respectivamente, a pesar de que el aislado 1238 tiene una AER alta no se utilizó en la formulación de los consorcios debido a que es incompatible con algunos aislados, como se discute en la sección 5.6.2, pero los aislados 1251 y 1244 se encuentran presentes en 3 de los 4 consorcios formulados en esta investigación, debido que presentan la mayor cantidad de características tanto promotoras del crecimiento de la plantas como antagonistas, como es el caso de esta prueba.

Producción de lipasas

Otra clase de enzimas producidas por ciertas cepas de PGPR son las lipasas que degradan algunos de los lípidos asociados a la pared celular, por lo que, pueden lisar las células fúngicas [54], la actividad lipasa de los aislados se determinó por el método de la hidrólisis de ácidos grasos de cadena larga unidos por ésteres, en este caso se utilizó Tween 80 (éster de ácido oleico) y se observó que casi todos los aislados presentan actividad lipasa a excepción de los aislados 1230, 1232 y 1242 (Tabla 11). Para esta prueba se utilizó la cepa 1316 productora de lipasas con AER de 2.22 como control positivo C (Figura 31). Los aislados con mayor AER fueron el 1252 y 1236 con AER de 2.17 y 2.12, respectivamente, cabe resaltar que el aislado 1252 se encuentra en los cuatro consorcios formulados en esta investigación.

Se determinó la actividad enzimática relativa para cada uno de los aislados en los ensayos de producción de quitinasas, amilasas y lipasas (fórmula 4.2), los resultados se muestran en la Tabla 11.

Producción de proteasas

Las proteasas son otras de las enzimas que producen algunas cepas de *Pseudomonas* a las que se le atribuye la actividad de biocontrol ya que éstas degradan las proteínas de la pared celular de los hongos [54]. La Figura 32 muestra el resultado de la prueba de

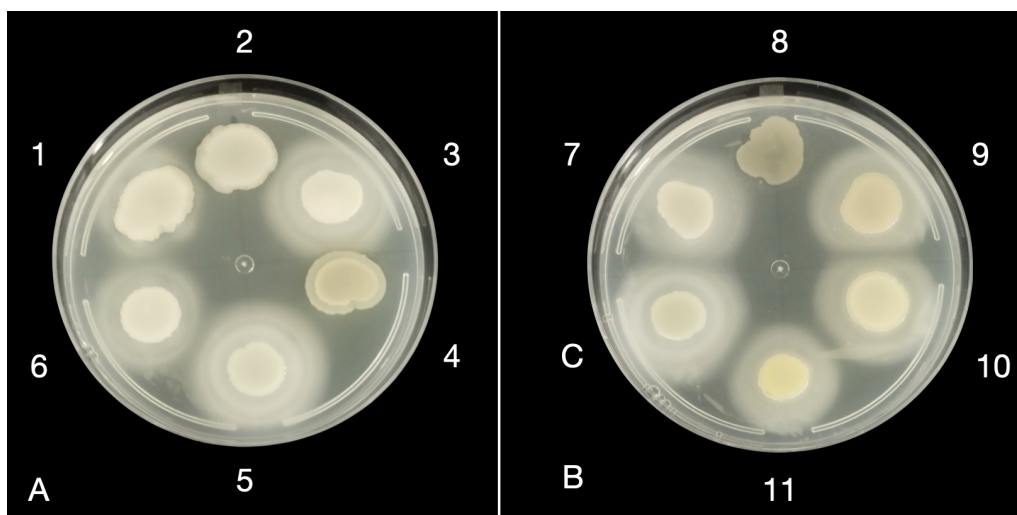


Figura 31: Producción de lipasas. Las bacterias se inocularon en medio Agar-Tween 80, la producción de lipasas se observa como un halo opaco alrededor de la colonia. Las placas se incubaron 6 días a 28 °C. Aislados bacterianos: 1-1228, 2-1230, 3-1232, 4-1234, 5-1236, 6-1238, 7-1240, 8-1242, 9-1244, 10-1251, 11-1252, C-1316.

Tabla 11: Actividad enzimática relativa de las bacterias

Número	Aislado	Quitinasa	Amilasa	Lipasa
1	1228	0	1.87	1.5
2	1230	0	0	0
3	1232	1.75	2.30	1.68
4	1234	0	0	0
5	1236	2.01	2.38	2.12
6	1238	2.34	2.61	2.69
7	1240	1.57	1.59	1.5
8	1242	1.43	0	0
9	1244	1.38	2.45	1.63
10	1251	0	3.81	1.83
11	1252	0	1.85	2.17

hidrólisis de la gelatina de cuatro aislados, la prueba se consideró positiva si posterior a la incubación (24 h a 28 °C), los tubos se incuban a 4 °C el medio gelatina nutritiva permaneció líquido mientras que las reacciones negativas fueron aquellas que se tornaron sólidos después de la refrigeración. Solo los aislados 1234, 1236 son productores de gelatinasas y el aislado 1238 presentó resultados variables, los aislados restantes no producen gelatinasa.

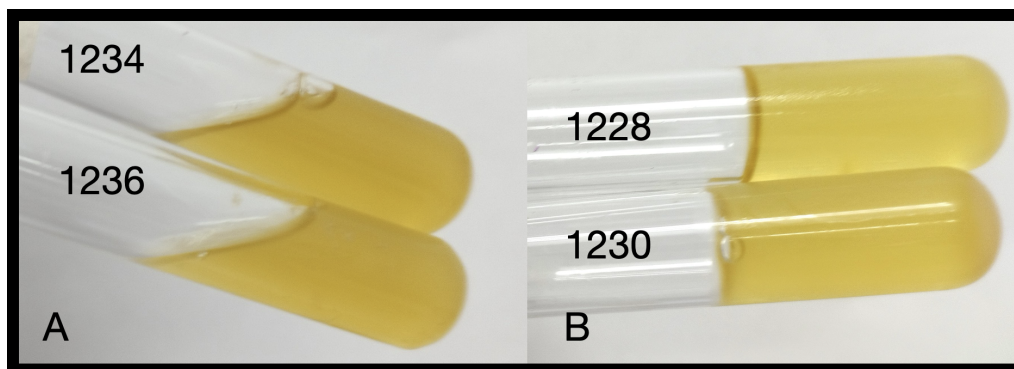


Figura 32: Ensayo de hidrólisis de la gelatina. A.- Reacción positiva, B.-Reacción negativa

5.6.2. Compatibilidad entre los aislados para conformación de consorcios

Un consorcio es una comunidad de microorganismos de diferentes especies que son compatibles entre sí que interactúan para realizar tareas complejas, compartir nutrientes y alimentarse de forma cruzada, para determinar la compatibilidad entre la colección de bacterias utilizadas, se realizó la prueba de compatibilidad entre los 11 aislados por medio de la técnica modificada de Kirby-Bauer. Esta técnica consiste en sembrar un tapete de la bacteria a probar y sobre éste sembrar el resto de las bacterias, en este caso los diez aislados restantes. En la Figura 33 se observan dos ejemplos de los resultados de este experimento (aislados 1228 y 1244), como se observa, el aislado 1244 es incompatible con los aislados 1228, 1230, 1238, 1234 y 1242 ya que se aprecia un halo de inhibición de crecimiento alrededor de la colonia. Las compatibilidades entre los aislados se muestran en la Tabla 12.

Como se observa los aislados 1228, 1230 y 1234 solo fueron compatibles con otros dos aislados por lo que fueron excluidos para una segunda prueba (Tabla 12). Los ocho aislados restantes fueron probados de nueva cuenta para descartar cualquier incompatibilidad entre ellos, en esta segunda prueba el aislado 1238 fue incompatible con la mayoría de los aislados por lo que también se excluyó su presencia de los consorcios (Tabla 13).

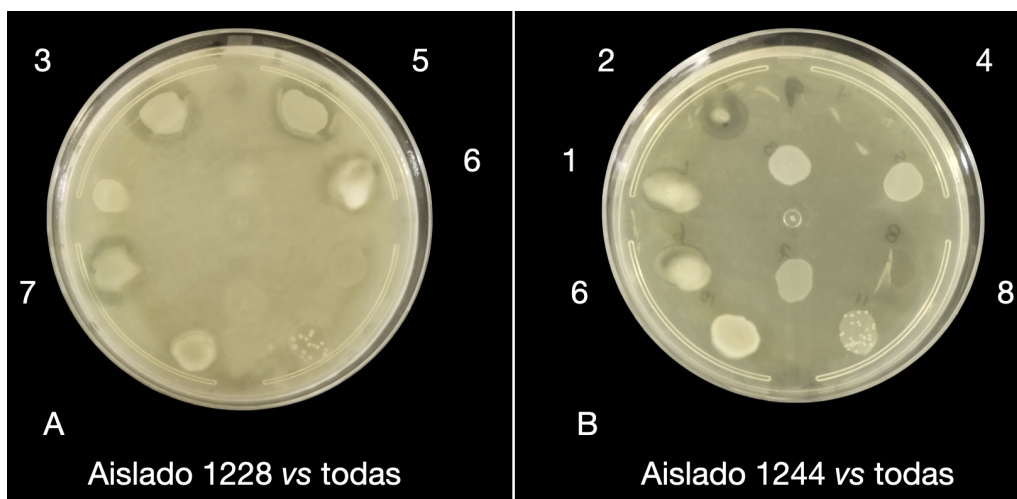


Figura 33: Prueba de compatibilidad entre los aislados bacterianos. A.-Resultados para es aislado 1228, donde se observa la incompatibilidad con la mayoría de los aislados; B.-Resultados para el aislado 1244 que muestra incompatibilidad con cinco aislados. Incubación a 28 °C por 48 h en agar Muller.

Tabla 12: Compatibilidad entre los aislados bacterianos

Aislado	1228	1230	1232	1234	1236	1238	1240	1242	1244	1251	1252
1228	...	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1230	+	...	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1232	-	-	...	-	+	-	+	+	+	-	+
1234	-	-	-	...	+	+	-	-	-	-	-
1236	-	+	+	-	...	+	-	-	-	+	+
1238	-	-	-	+	+	...	-	+	-	-	-
1240	-	+	+	-	-	-	...	-	+	-	+
1242	+	-	+	+	-	+	+	...	-	+	+
1244	-	-	+	-	+	-	+	-	...	+	+
1251	-	-	-	-	+	-	-	+	+	...	+
1252	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	...

+ Compatible, - incompatible, ... interacción con la misma bacteria.

Posterior a este ensayo, los aislados utilizados con base en su compatibilidad para la formulación de los consorcios fueron siete: 1232, 1236, 1240, 1242, 1244, 1251 y 1252.

Tabla 13: Segunda prueba de compatibilidad entre los aislados bacterianos

Aislado	1232	1236	1238	1240	1244	1242	1251	1252
1232	...	+	-	+	+	+	-	+
1236	+	...	+	-	-	+	+	+
1238	-	+	...	-	+	-	-	-
1240	+	-	-	...	+	+	-	+
1244	+	+	-	+	-	...	+	+
1251	-	+	-	-	+	+	...	+
1251	+	+	-	+	+	+	+	...

+ Compatible, - incompatible, ... interacción con la misma bacteria.

5.6.3. Consorcios microbianos formulados para esta investigación

Se llevó a cabo un análisis factorial mixto mediante el paquete PCAmixdata [108] en Rstudio [69] con los datos obtenidos de las características antagónicas y promotoras del crecimiento de las plantas Tablas 9, 10 y 11 este análisis permite conocer la similitud entre los aislados que son compatibles utilizando variables de tipo mixto, además de explorar la relación entre las variables cualitativas y cuantitativas [109]. Las metas de un análisis de componentes principales engloban: simplificar la descripción del conjunto de datos, extraer la mayor cantidad de información de los datos, analizar la estructura de las observaciones y las variables, así como, comprimir el tamaño del conjunto de datos al conservar sólo la información importante [110].

En el caso de esta investigación el análisis de componentes principales redujo la dimensionalidad del conjunto de datos a 6 dimensiones, donde las 3 primeras contribuyen con el 77% de la inercia de la Tabla, la inercia es la importancia de un componente o la proporción explicada por ese factor [110]. En la Figura 34 podemos observar que en las primeras dos dimensiones de este análisis se concentran los círculos con radios más grandes y con colores más intensos, en el primer componente los factores que más contribuyen son la solubilización de fosfatos, la producción de amilasas, lipasas y producción de pigmentos de fenazina, mientras que, en el segundo componente los factores con mayor

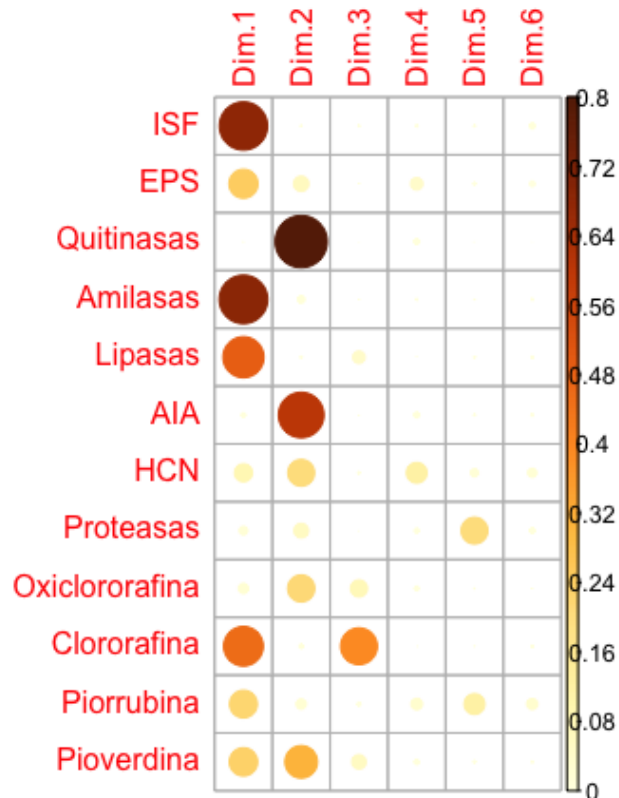


Figura 34: Análisis de contribución entre las características PGPR y BCA. Las variables con círculos más grandes tienen una mejor representación en esta investigación. ISF: índice de solubilización de fosfatos, EPS: producción de polisacáridos extracelulares, AIA: ácido indol acético, HCN: ácido cianhídrico, Dim: dimensiones del análisis.

contribución son la producción de quitinasas y ácido indol acético.

Para las variables cuantitativas la Figura 35 muestra la correlación entre dichas variables, como se observa en la imagen, el primer componente separa la producción de polisacáridos extracelulares y quitinasas de la producción de amilasa, lipasa y de la solubilización de fosfatos, este último correlaciona negativamente con la producción de polisacáridos extracelulares, así como también existe una correlación negativa entre la producción de quitinasas y la producción de otras enzimas hidrolíticas amilasa y lipasa. Lo anterior sugiere que aquellas bacterias que solubilizan fosfatos no producen polisacáridos extracelulares y aquellos producen quitinasas, no producen amilasas y lipasas, mientras que la variable que más contribuye es la producción de amilasas y la de menor contribu-

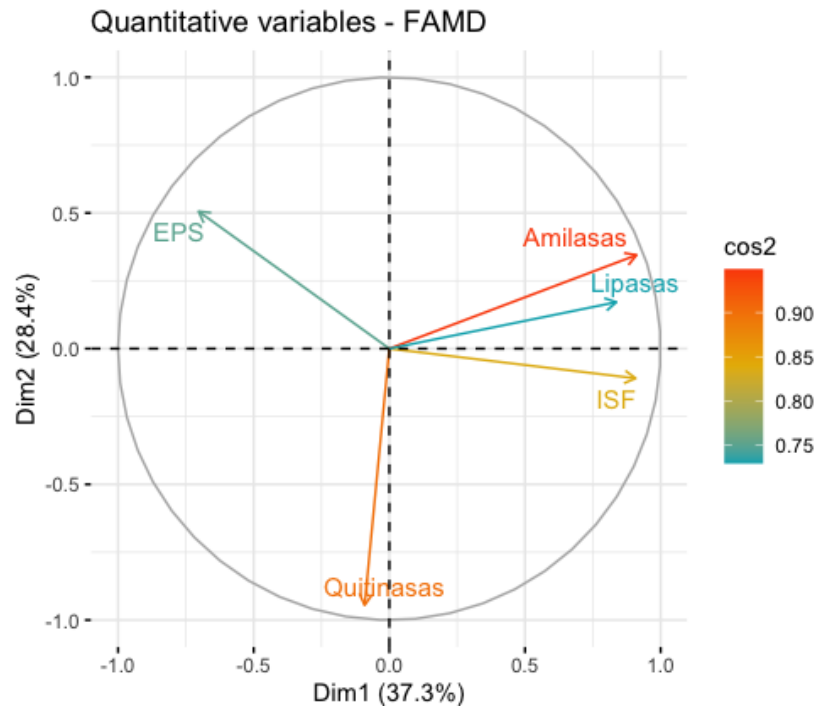


Figura 35: Análisis de correlación entre las variables cuantitativas en los dos componentes principales

ción es la producción de lipasas.

Por otro parte, la correlación entre las variables cualitativas en el análisis de componentes principales y los aislados bacterianos se muestra en Figura 36, en este se muestra que los aislados 1232, 1236 y 1242 son los que contribuyen más a la dimensión 1, mientras que los aislados 1251 y 1252 contribuyen de manera significativa a la dimensión 2, en cuanto a las características tanto promotoras del crecimiento vegetal, así como, antagonista que presentan los aislados y que fueron codificadas en este análisis como variables cualitativas la producción de pigmentos clororafina, piorrubina y pioverdina contribuyen o se encuentran mejor representadas en la dimensión 1, mientras que en la dimensión 2 las características que más contribuyen son la producción de ácido indol acético, ácido cianhídrico y pigmentos como pioverdina y clororafina.

De lo anterior se concluye que los pigmentos se encuentran representados de igual manera entre los aislados que conforman los consorcios, a diferencia de la producción de

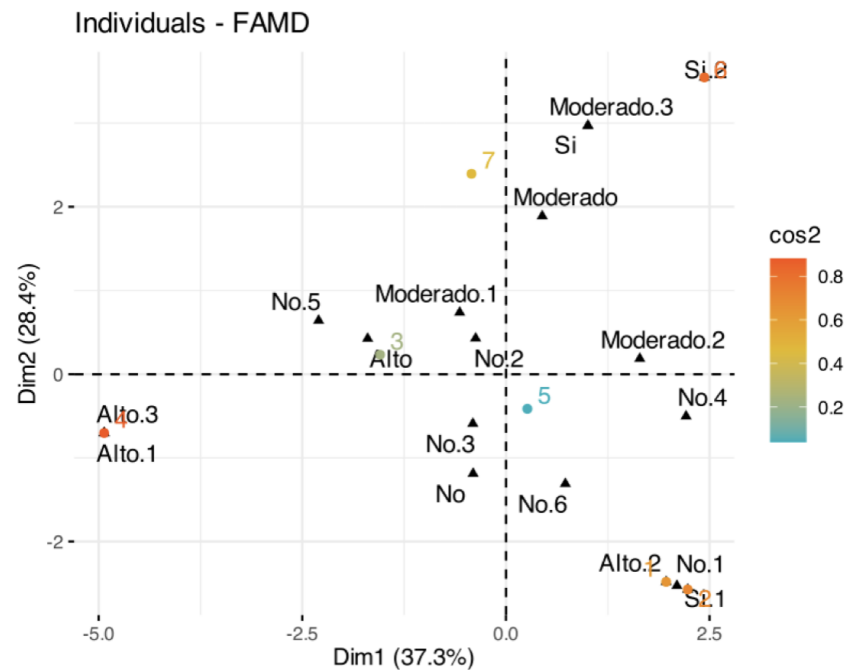


Figura 36: Análisis de correlación múltiple entre las variables cualitativas en los dos componentes principales.

HCN y AIA que se encuentran presentes en los aislados 1251 y 1252, mientras que, la producción de piorrubina se encuentra mejor representada en los aislados 1232, 1236 y 1242, en la Figura 37 se presenta el análisis de correlación, pero solo se muestran los aislados bacterianos. Para potenciar los efectos tanto promotores del crecimiento vegetal como antagónicos es importante que los consorcios tengan bacterias que no solo sean compatibles, sino que además presenten la mayor cantidad de características para así conseguir un manejo sostenible del Tizón sureño y mejorar la eficacia de biocontrol al conformar consorcios con especies que presenten diferentes mecanismos de control biológico.

Para establecer y utilizar los consorcios se tomó en cuenta el resultado del punto anterior, es decir la compatibilidad entre ellos, además se consideró aquellas bacterias con mayores características tanto promotoras del crecimiento vegetal como antagónicas que junto al análisis factorial mixto nos permitió obtener los siguientes consorcios(CS) denominados: CS1, CS2, CS3 y CS4 (Tabla 14).

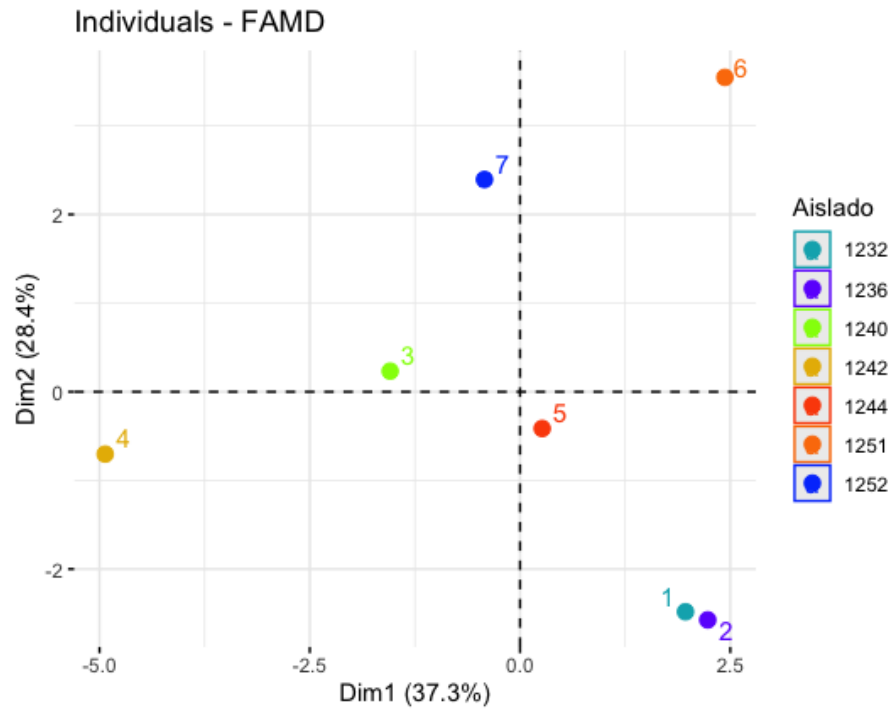


Figura 37: Aislados bacterianos con mayor potencial para promover el crecimiento de las plantas y antagonizar fitopatógenos.

Tabla 14: Consorcios microbianos

Consorcio	Aislado	Especie
CS1	1242 1251 1252	<i>P. mediterranea</i> , <i>K. oxytoca</i> y <i>P. putida</i>
CS2	1244 1251 1252	<i>V. paradoxus</i> , <i>K. oxytoca</i> y <i>P. putida</i>
CS3	1232 1240 1244 1252	<i>P. putida</i> , <i>P. lini</i> , <i>V. paradoxus</i> y <i>P. putida</i>
CS4	1236 1244 1251 1252	<i>P. lini</i> , <i>V. paradoxus</i> , <i>K. oxytoca</i> y <i>P. putida</i>

5.7 Pruebas de antagonismo contra *Sclerotium rolfsii*: difusión de los metabolitos en el medio de cultivo

Se determinó la capacidad de los cuatro consorcios formulados para inhibir el crecimiento micelial y producción de esclerocios de *S. rolfsii* in vitro mediante el método del papel celofán que consiste en la siembra de los consorcios sobre dicho material en una placa de PDA. Las cajas se incubaron a 28 °C por 96 h, posteriormente se retiró la membrana de celofán y sobre estas placas, impregnadas con los metabolitos secretados por los consorcios, se colocó un disco de micelio de cada uno de los aislados de *S. rolfsii* AHE y HAA, las cajas de Petri se mantuvieron a temperatura ambiente hasta por 30 días. En la Figura 38 se observan los resultados del experimento para el aislado AHE de *S. rolfsii*.

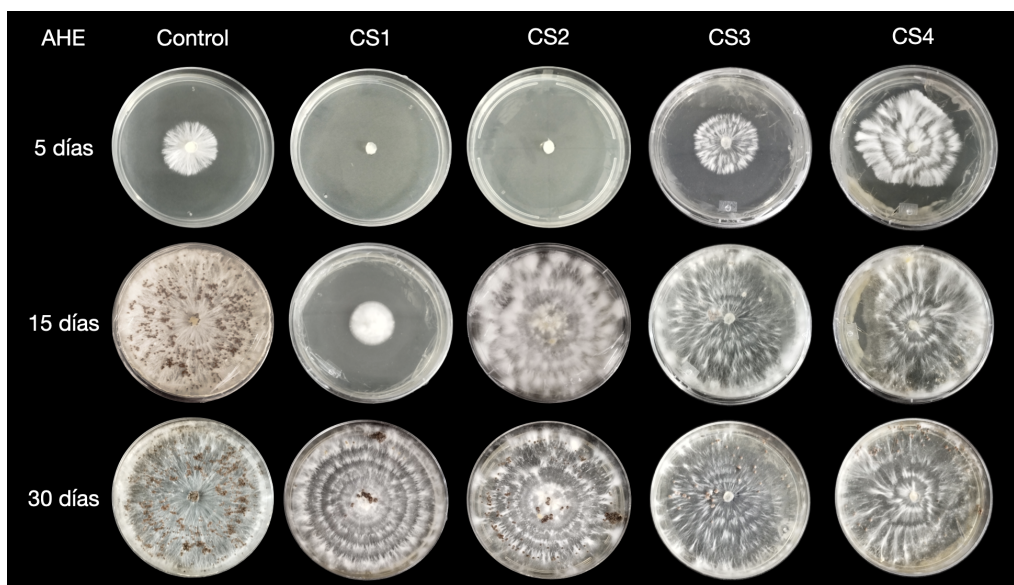


Figura 38: Experimento de confrontación que muestra el efecto de los metabolitos difusibles producidos por los consorcios a los 5, 15 y 30 días después de la inoculación del aislado AHE de *S. rolfsii*.

A los 5 días de incubación en las cajas con CS1 y CS2 la inhibición en el crecimiento micelial es más clara en comparación con CS3 y CS4, así como el control. Posteriormente

a los 15 días de incubación el control ya muestra producción de esclerocios a diferencia de los tratamientos en donde incluso en el tratamiento CS1 el micelio aún no ha cubierto por completo la superficie de la placa y los otros tratamientos CS2, CS3, y CS4 presentan un micelio delgado en comparación del control. Finalmente, a los 30 días se observa que la producción de esclerocios disminuyó en todos los tratamientos en comparación del control, además los esclerocios producidos en las placas con los tratamientos CS3 y CS4 muestran esclerocios de color blanco a diferencia de los esclerocios producidos en el control que de color marrón. En este punto se llevó a cabo la colecta de esclerocios (Tabla 15). El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se determinó con la fórmula 4.3, el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios (IPE) fórmula 4.4. Todos los tratamientos inhibieron la producción de esclerocios con porcentajes que van desde el 66 % al 94 % para el aislado de *S. rolfsii* AHE, en cuanto a la inhibición del crecimiento micelial el mejor tratamiento en este caso fue CS1 con un porcentaje de inhibición del 74 % (Tabla 15).

Tabla 15: Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en AHE por acción de los metabolitos difusibles secretados por los consorcios microbianos

Tratamiento	Crecimiento radial (cm)		Producción de esclerocios	
	Σ Micelio	% Inhibición	Σ Esclerocios	% IPE
Control	4.6	–	496	–
CS1	1.2	74	96.33	80.55
CS2	1.58	66	183	66
CS3	1.72	63	29.66	94
CS4	2.12	54	79	84

IPE: porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios

Como se observa en la Figura 39 y 40 todos los tratamientos muestran diferencias estadísticas significativas cuando se comparan contra el control. *S. rolfsii* es un fitopatógeno que devasta cultivos y se caracteriza por la producción de esclerocios, una de las alternativas ecológicas para el tratamiento del Tizón sureño es el empleo de agentes de control biológico, las *Pseudomonas* tiene una capacidad extraordinaria para producir una amplia

5.7. PRUEBAS DE ANTAGONISMO CONTRA *SCLEROTIUM ROLFSII*: DIFUSIÓN DE LOS ME

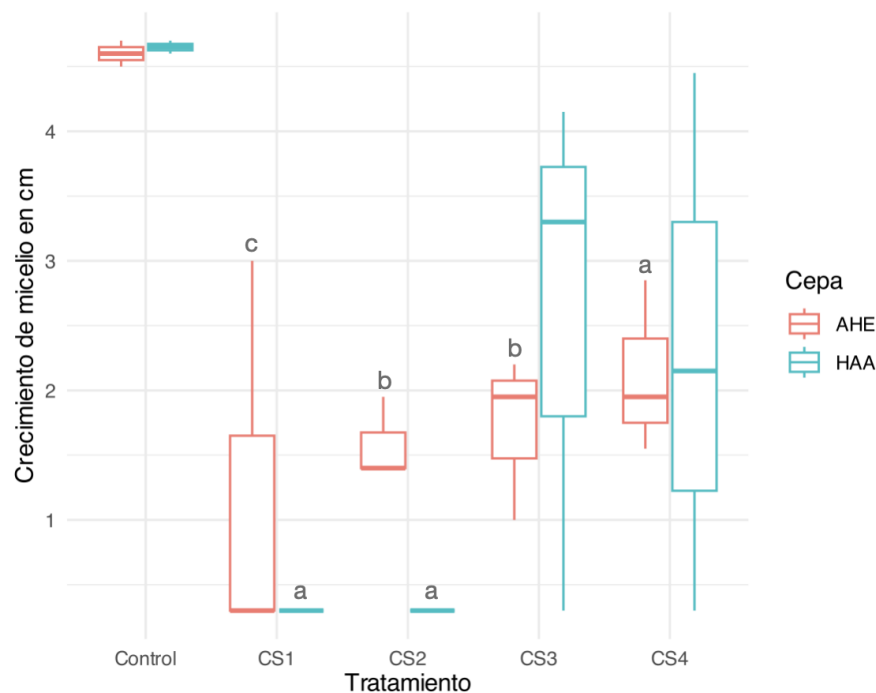


Figura 39: Inhibición en el crecimiento micelial en ambas cepas de *S. rolfsii* por acción de los metabolitos difusibles secretados por los consorcios. Diferencias significativas respecto del control según la prueba de Duncan a: $p < 0,005$, b: $p < 0,003$ y c: $p < 0,001$.

variedad de metabolitos y ejercer múltiples tipos de acción, estos incluyen la producción de antifúngicos difusibles como los pigmentos de fenazina y enzimas hidrolíticas como las proteasas, lipasas, amilasas y quitinasas [58]. La producción de enzimas líticas se considera la principal actividad antagónica de las *Pseudomonas fluorescentes* pertenecientes a las PGPR y se está explotando ampliamente para el manejo de enfermedades en los cultivos [111]. Cada uno de los consorcios contiene al menos una especie de *Pseudomonas* y algunos incluso dos especies, además en todos los consorcios al menos uno de los aislados que lo conforman es productor tanto de quitinasas, como de proteasas, amilasas y lipasas, también producen pigmentos de fenazinas, sideróforos y HCN, por lo que puede atribuirse a la producción de estos metabolitos su eficacia para inhibir el crecimiento micelial y la producción de esclerocios en el aislado AHE de *S. rolfsii*.

Como se indicó previamente trabajamos con dos aislados de *S. rolfsii*, AHE y HAA,

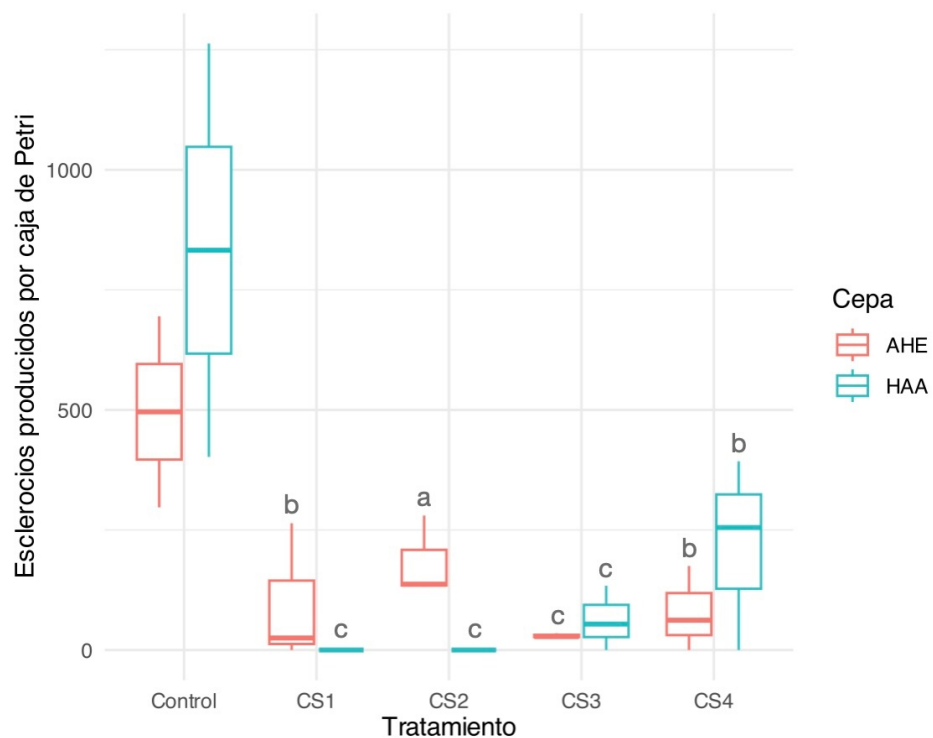


Figura 40: Inhibición en la producción de esclerocios en ambas cepas de *S. rolfsii* debido a los metabolitos difusibles en el medio de cultivo de los consorcios. Diferencias estadísticas significativas respecto del control según la prueba de Duncan a: $p < 0,05$, b: $p < 0,006$ y c: $p < 0,002$.

en el caso del aislado de *S. rolfsii* HAA también se realizó el experimento del método del papel celofán para conocer el efecto de la difusión de los metabolitos en el medio de cultivo secretados por los consorcios sobre dicho aislado del fitopatógeno. Posterior a los 5 días de incubación la inhibición del crecimiento micelial es más clara con los tratamientos CS1 y CS2 en comparación con los otros dos tratamientos y el control (Figura 41), a los 15 días a pesar de que en las placas con los tratamientos CS3 y CS4 el micelio cubrió por completo la caja de Petri éste en comparación con el micelio del control es más delgado, además se observa que en dichos tratamientos la producción de esclerocios disminuyó, por último a los 30 días en el caso de los tratamientos CS1 y CS2 inhibieron por completo el crecimiento de micelio y la posterior producción de esclerocios, mientras que los tratamientos CS3 y CS4 disminuyeron la producción de esclerocios, éstos se observaron más

5.7. PRUEBAS DE ANTAGONISMO CONTRA *SCLEROTIUM ROLFSII*: DIFUSIÓN DE LOS ME

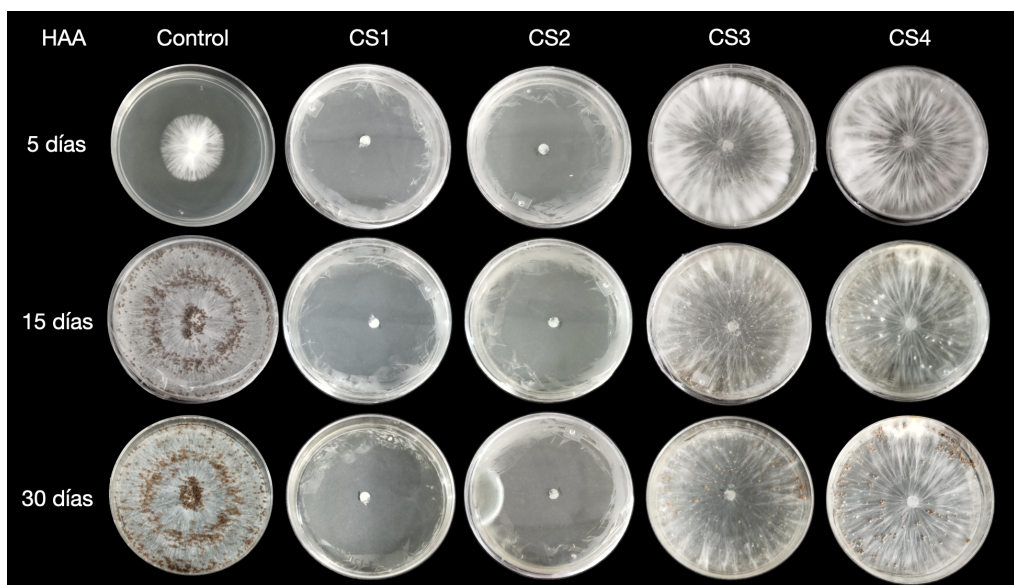


Figura 41: Experimento de confrontación dual que muestra el efecto de los metabolitos difusibles producidos por los consorcios a los 3, 15 y 30 días después de la siembra del aislado HAA de *S. rolfsii*.

claros y pequeños en comparación con los producidos en el control (Figura 41).

Tabla 16: Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en HAA por acción de los metabolitos difusibles secretados por los consorcios microbianos

Tratamiento	Crecimiento radial (cm)		Producción de esclerocios	
	Σ Micelio	% Inhibición	Σ Esclerocios	% IPE
Control	4.65	–	832.5	–
CS1	0	100	0	100
CS2	0	100	0	100
CS3	2.58	44	62.66	93
CS4	2.3	51	216	74

A los 7 días después de la siembra del disco de micelio con crecimiento activo del aislado HAA se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial en cm fórmula 4.3, posteriormente a los 30 días se realizó la colecta de los esclerocios producidos y se determinó el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios (IPE) (fórmula 4.4). Los consorcios CS1 y CS4 inhibieron por completo, tanto el crecimiento de micelio como

la producción de esclerocios, mientras que los tratamientos CS3 y CS4 inhibieron el crecimiento micelial radial en 44 y 51 %, respectivamente, además redujeron la producción de esclerocios en un 93 a 74 %, respectivamente (Tabla 16).

Posterior a realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos se determinó que en los tratamientos CS1 y CS2 existen diferencias estadísticas significativas al compararlas con el control en cuanto al crecimiento micelial radial (Figura 39), esto como resultado de la presencia de metabolitos difusibles secretados por los consorcios. Por otra parte, al analizar los datos de producción de esclerocios se observó que todos los consorcios disminuyeron de manera significativa comparadas con el control (Figura 40). Como se comentó anteriormente uno de los principales mecanismos que tienen las diferentes cepas de PGPR es la producción de metabolitos con actividad antifúngica como las enzimas hidrolíticas, pigmentos de fenazina y sideróforos [58]. Como se mostró en la sección 5.6.1, en todos los consorcios tenemos presencia de aislados capaces de producir enzimas líticas como las quitinasas, las amilasas, las lipasas y las proteasas, además de que algunos producen sideróforos, que privan a los fitopatógenos de hierro [26], por lo que a estos metabolitos se les puede atribuir el efecto de biocontrol observado en este experimento. Además otro mecanismo de biocontrol que poseen las PGPR es la desintoxicación de los factores de virulencia producidos por los fitopatógenos que incluyen la producción de una proteína que se une a la toxina, por ejemplo, *Klebsiella oxytoca*, *Alcaligenes denitrificans* y *Pantoea dispersa* producen una esterasa que se une a la albicina toxina que produce *Xanthomonas albilineans* [43].

5.8 Pruebas de antagonismo: cultivo dual barrera física

Las bacterias se caracterizan por producir una gran cantidad de metabolitos secundarios que muestran actividad biológica. Algunos de estos metabolitos tienen la característica de ser volátiles (COVs) varios con actividad antibiótica como el ácido cianhídrico [43]. Para ensayar el posible efecto de los COVs producidos por los consorcios en el crecimiento micelial y producción de esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii*, se realizó la prueba de cultivo en conjunto en caja de Petri con una división, en el lado derecho de la placa se sembró uno de los cuatro consorcios (AN) y en el lado izquierdo (PDA) un disco de micelio con crecimiento activo del aislado AHE de *S. rolfsii*. Después de 5 días de incubación conjunta en la placa control, el micelio cubrió por completo la superficie del PDA a diferencia de los tratamientos (Figura 42). A los 15 días los tratamientos CS3 y CS4 no muestran producción de esclerocios en contraste con el control y los demás tratamientos (Figura 42), para los 30 días posteriores a la siembra conjunta se observa una disminución en la masa de micelio y producción de esclerocios en los tratamientos comparados con el control (Figura 42).

Por otra parte, luego de 7 días de incubación conjunta sin abrir la caja de petri se midió el crecimiento radial del micelio en dos direcciones verticales, para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial empleando las fórmula 4.5, después de 30 días de incubación se realizó la colecta de los esclerocios producidos en todos los tratamientos y se calculó el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios con la fórmula 4.4, en este caso se encontró que el CS3 redujo en 66 % y 82 %, respectivamente en comparación con el control, logrando los porcentajes de inhibición más altos en el aislado del hongo AHE por este método de confrontación (Tabla 17).

Al realizar el análisis estadístico de los datos (Figura 43 y 44) se encontró que los tratamientos presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan $p < 0,005$

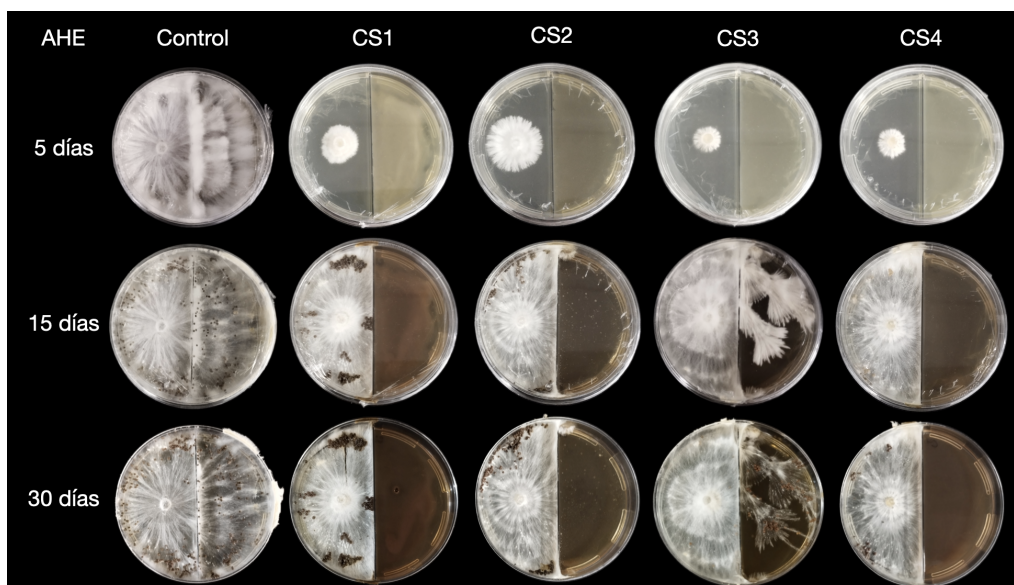


Figura 42: Efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios en el crecimiento micelial y la producción de esclerocios en el aislado AHE de *S. rolfsii*. Caja dividida, incubación temperatura ambiente.

cuando se comparan contra el control, es decir, que existe un efecto negativo tanto en el crecimiento micelial, así como, en la producción de esclerocios en el aislado AHE de *S. rolfsii*. Este efecto se puede atribuir a la producción de COVs por parte de los aislados bacterianos que conforman los consorcios en esta investigación, ya que, la secreción de compuestos volátiles orgánicos de bajo peso molecular, con actividad antibiótica producidos por algunas bacterias, desempeña un papel principal en el biocontrol de enfermedades en plantas [43]. Dentro de los COVs producidos por bacterias encontramos: aldehídos,

Tabla 17: Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en AHE por acción de los compuestos volátiles secretados por los consorcios

Tratamiento	Crecimiento radial (cm)		Producción de esclerocios	
	Σ Micelio	% Inhibición	Σ Esclerocios	% IPE
Control	6.53	–	350	–
CS1	2.66	59	87.33	75
CS2	2.9	56	104.66	70
CS3	2.25	66	61.66	82
CS4	2.83	57	78	77

sulfuros, alcoholes, cetonas y HCN, este último se considera el metabolito más importante entre ellos, e incluso, se ha reportado que en alfalfa una cepa de *P. putida* productora de HCN detuvo la infección provocada por *F. solani* [28]. Cabe destacar que la mayoría de los aislados que se encuentran en los consorcios aquí estudiados son productores de HCN (sección 5.6.1).

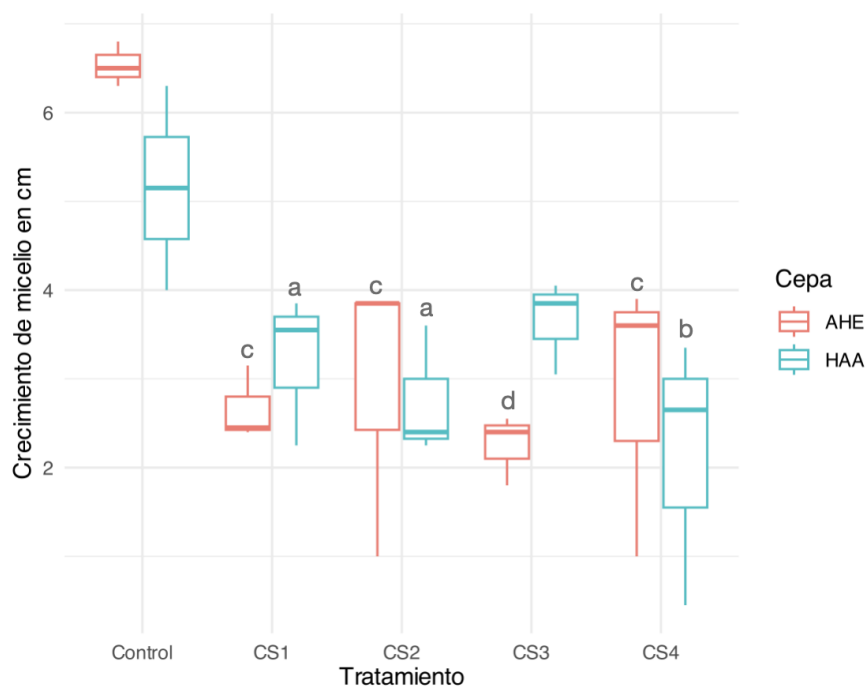


Figura 43: Inhibición del crecimiento de micelio en ambas cepas de *S. rolfsii* por efecto de los COVs producidos por los consorcios. Diferencias significativas según la prueba de Duncan a: $p < 0,05$, b: $p < 0,008$, c: $p < 0,005$ y d: $p < 0,002$.

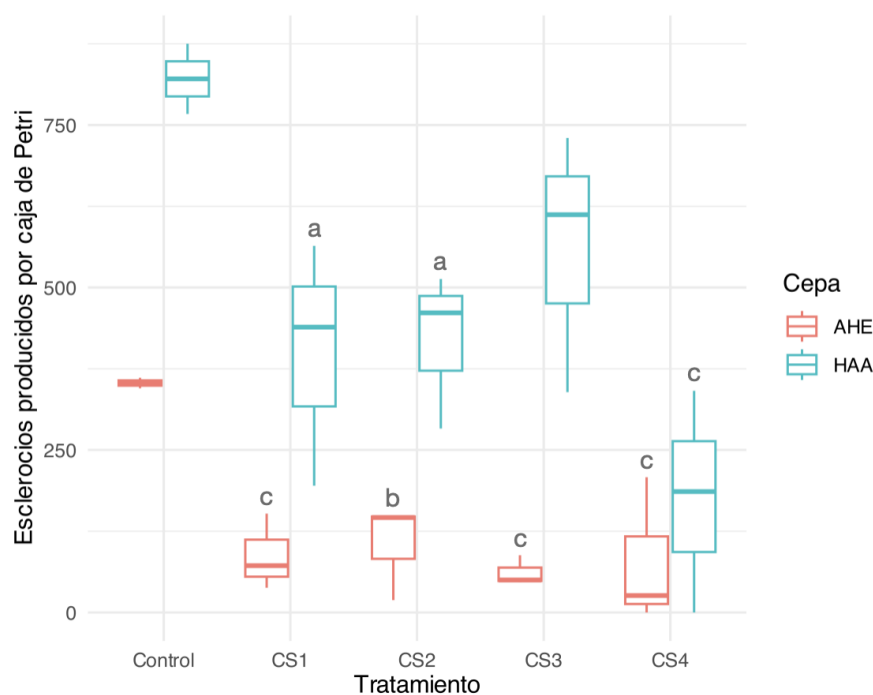


Figura 44: Inhibición en la producción de esclerocios en ambas cepas de *S. rolfsii* por efecto de los COVs al crecer junto a los consorcios. Diferencias significativas según la prueba de Duncan a: $p < 0,05$, b: $p < 0,002$ y c: $p < 0,001$.

De igual manera se examinó los posibles efectos de los COVs producidos por los consorcios tanto en el crecimiento micelial, así como, en la producción de esclerocios en el aislado de *S. rolfsii* HAA, para ello se realizó el experimento de confrontación dual como se describió anteriormente. Después de 5 días de incubación conjunta (Figura 45) el micelio del hongo en los tratamientos no ha cubierto por completo la placa, en contraste con el control, que incluso muestra el comienzo de la producción de esclerocios, se observan los inicios del esclerocios, es decir, la acumulación de hifas. A los 15 días se observan esclerocios en todas las cajas, pero se aprecia la disminución de estos en las placas de los tratamientos. Para finalizar el experimento a los 30 días se observan los esclerocios maduros y en algunos casos el micelio no cubrió por completo la caja de Petri, sin embargo, en algunos casos se observó sobrecrecimiento de micelio en el tapete bacteriano a pesar de la barrera física de la placa (Figura 45).

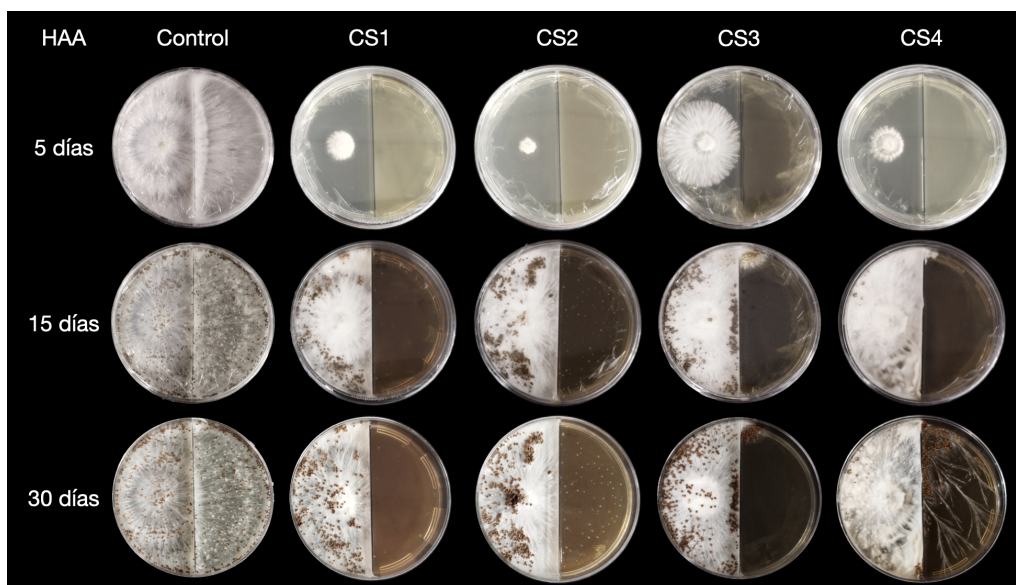


Figura 45: Efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios sobre el crecimiento micelial y producción de esclerocios en el aislado HAA de *S. rolfsii*.

Posterior a los 7 días de incubación conjunta se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, sin abrir la caja (fórmula 4.5), después de 30 días de incubación conjunta se recolectaron los esclerocios, se contaron y se calculó el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios (fórmula 4.4) (Tabla 18). En este caso se observa que en promedio el aislado HAA (821) produjo mayor cantidad de esclerocios en comparación con el aislado AHE (350) (Tabla 17) esto en congruencia con los resultados obtenidos en el experimento de cultivo dual por el método del papel celofán, además en este experimento el mayor porcentaje de inhibición tanto del crecimiento micelial como de la producción de esclerocios fue obtenido por el consorcio CS4 con 58 % y 79 %, respectivamente.

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos, en cuanto a la inhibición del crecimiento micelial en el aislado de *S. rolfsii* HAA por medio del cultivo dual con los consorcios formulados en esta investigación (Figura 43), se encontró que existen diferencias significativas (ANOVA, $p = 0,04$), al realizar la prueba de Duncan ($p < 0,05$) los tratamientos CS2 y CS4 presentaron diferencias estadísticas significativas cuando se

Tabla 18: Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en HAA por acción de los compuestos volátiles secretados por los consorcios microbianos

Tratamiento	Crecimiento radial (cm)		Producción esclerocios	
	Σ Micelio	% Inhibición	Σ Esclerocios	% IPE
Control	5.15	–	821	–
CS1	3.21	38	399.33	51
CS2	2.75	48	419	49
CS3	3.65	29	560.33	32
CS4	2.15	58	175.66	79

compara contra el control, mientras que en la prueba de Tukey ($p = 0,03$) solo CS4 presenta diferencias respecto del control, lo que indica que existe un efecto negativo en el crecimiento micelial es este aislado del fitopatógeno debido a la producción de COVs por parte de los consorcios.

Por otra parte, en lo que se refiere a la inhibición en la producción de esclerocios en el aislado de *S. rolf sii* HAA por medio del cultivo dual (Figura 44) se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p = 0,006$), al comparar respecto al control los consorcios CS1 y CS4 presentaron diferencias significativas Tukey $p < 0,05$, según la prueba de Duncan y LSD de Fisher los consorcios CS1, CS2 y CS4 presentaron diferencias significativas $p < 0,05$. Como se mencionó anteriormente, la producción de HCN es un determinante en el biocontrol, todos los consorcios están conformados por al menos tres aislados bacterianos productores de HCN, resulta interesante investigar otra clase de COVs producidos por los aislados presentes en los consorcios que permita explicar las diferencias observadas. La disminución en la producción de esclerocios es bastante clara, el estudio de los COVs producidos por los consorcios es un área de sumo interés que contribuye a la búsqueda de mecanismos de control biológico contra *S. rolf sii*.

5.9 Pruebas de antagonismo: cultivo dual sin barrera “confrontación”

Para ensayar el posible efecto tanto de los metabolitos volátiles como los no volátiles es decir los difusibles al medio de cultivo con actividad antifúngica producidos por los consorcios se realizó el experimento de cultivo dual, en esta ocasión en una caja de Petri sin división física. Estas placas contenían PDA del lado izquierdo, parte en la que se sembró el disco de micelio activo de uno de los aislados de *S. rolfsii* y AN del lado derecho 3 cm antes del borde, parte en la que se sembraron los consorcios bacterianos. En cuanto al aislado de *S. rolfsii* AHE después de 5 días de incubación conjunta con los consorcios (Figura 46), en las cajas con los tratamientos se observa una repulsión del micelio, ondas, hacia la zona de crecimiento de los consorcios.

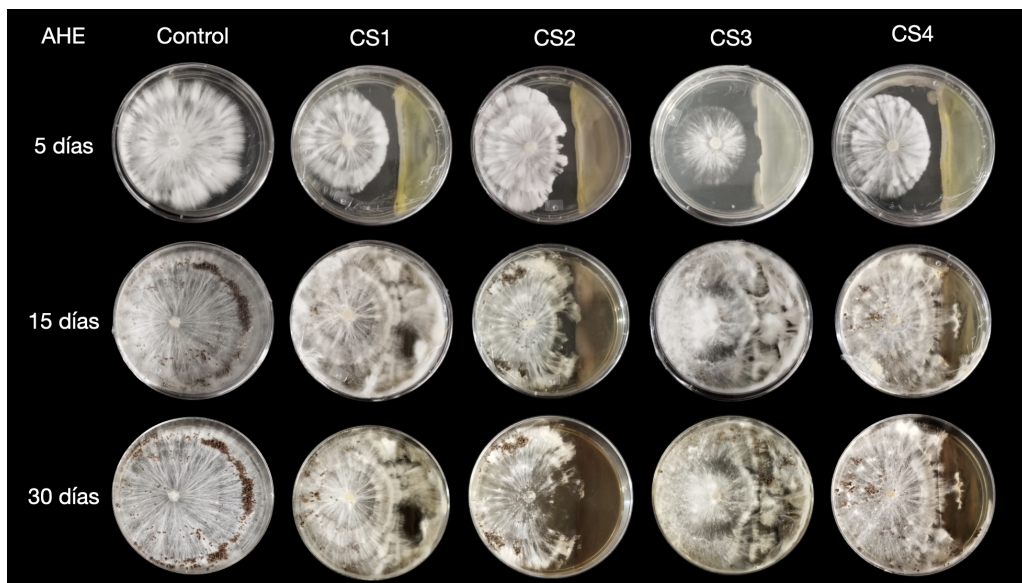


Figura 46: Prueba de confrontación por el método de cultivo dual entre los consorcios vs el aislado AHE de *S. rolfsii*.

Después de 15 días de incubación, en los tratamientos CS1 y CS3 no se aprecia producción de esclerocios, a diferencia del control y en las placas con los tratamientos CS2 y CS4 se observa una clara disminución en la producción de estos. A los 30 días de incuba-

ción se muestra la disminución en la producción de esclerocios en todos los tratamientos comparados con el control.

Posterior a 7 días de incubación dual se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de micelio en dos direcciones verticales, sin abrir la caja sellada con una película de PVC (fórmula 4.5) (Tabla 19). En este caso se observó que el tratamiento CS1 obtuvo el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial con 47 %.

Posterior a 30 días de incubación los esclerocios se recolectaron, se contaron y se determinó el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios (fórmula 4.4) (Tabla 19), donde el tratamiento CS1 inhibió hasta en 87 % la producción de esclerocios en el aislado de *S. rolfsii* AHE, seguido del tratamiento CS4 con 68 % de inhibición. Es importante recalcar que en CS3, si hubo un sobrecrecimiento del hongo sobre la bacteria.

Tabla 19: Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en AHE por acción de los metabolitos secretados por los consorcios ensayo de confrontación

Tratamiento	Crecimiento radial (cm)		Producción esclerocios	
	Σ Micelio	% Inhibición	Σ Esclerocios	% IPE
Control	5.35	–	362	–
CS1	2.82	47	61.33	87
CS2	3.08	42	148.33	59
CS3	3.35	37	161.55	55
CS4	2.97	44	115.66	68

De la manera descrita anteriormente se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos, en cuanto a la inhibición del crecimiento micelial (Figura 47) se encontró que a pesar de que no existen diferencias estadísticas significativas (ANOVA, $p = 0,176$) al realizar la prueba de LSD de Fisher $p < 0,05$ se encontró que CS1 y CS4 presentaron diferencias respecto del control.

Por otra parte, al analizar los datos sobre el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios (Figura 48) se encontró que no hay diferencias significativas (ANOVA,

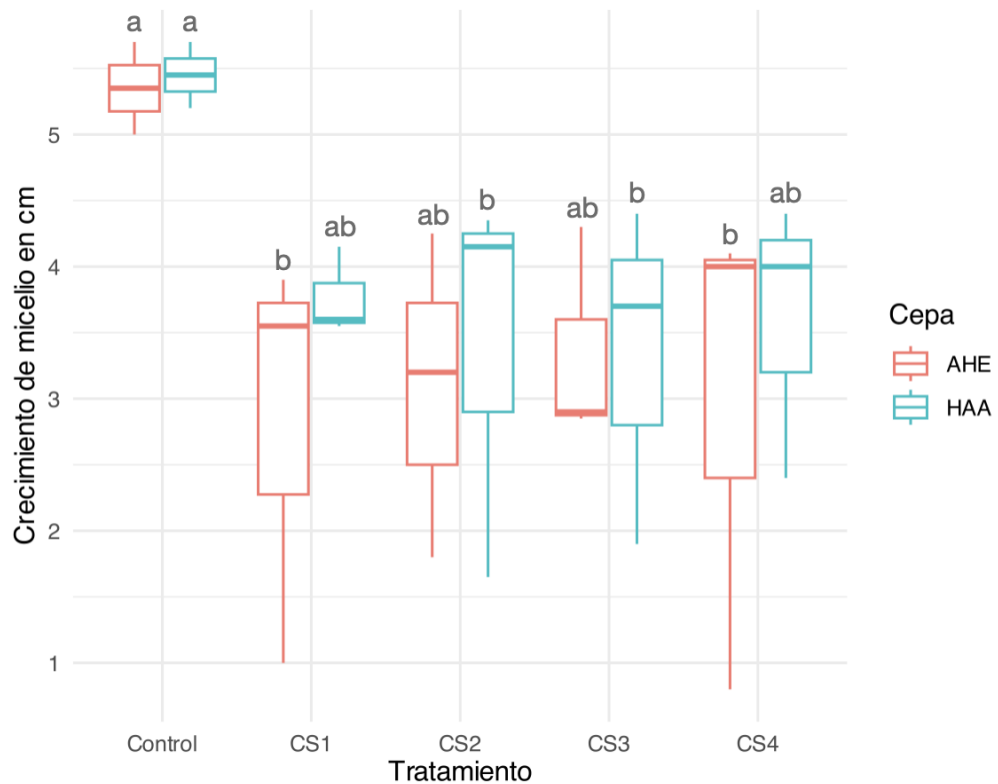


Figura 47: Inhibición en el crecimiento micelial en ambas cepas de *S. rolfsii* en presencia de los consorcios. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba LSD de Fisher $p < 0,05$.

$p = 0,175$) sin embargo al realizar la prueba de Duncan $p < 0,04$ y la de LSD de Fisher $p < 0,05$ el consorcio CS1 presentó diferencias en la producción de esclerocios comparado contra el control. Las diversas cepas de PGPR presentan diferentes capacidades para producir una gama de metabolitos con actividad antifúngica estas incluyen la síntesis de sideróforos que forman quelatos de hierro haciéndolos inaccesibles para los fitopatógenos, la producción de enzimas líticas que lisan las paredes celulares de los hongos o la secreción de COVs como el HCN que suprime el crecimiento de los hongos patógenos [58]. En el caso del aislado de *S. rolfsii* AHE el empleo de CS1 mostró un efecto negativo en este experimento potencialmente debido a la producción de moléculas con actividad antifúngica.

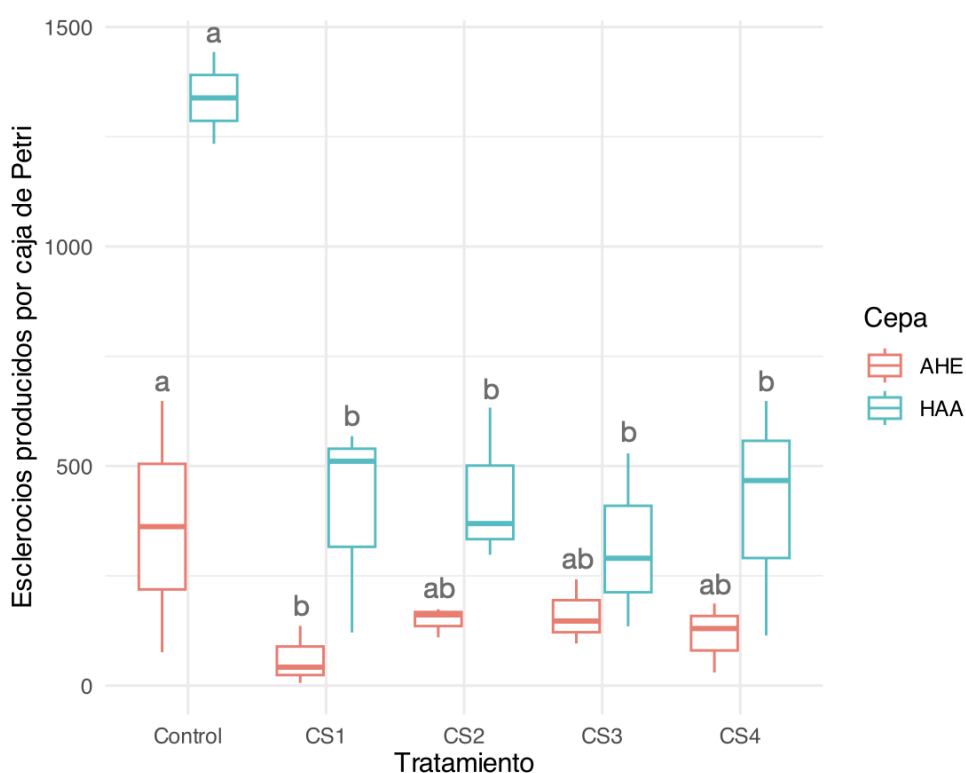


Figura 48: Inhibición de la producción de esclerocios en ambas cepas de *S. rolfsii* por acción de los consorcios. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba LSD de Fisher $p < 0,05$.

Para ensayar el efecto de los metabolitos con actividad antifúngica secretados por los consorcios en el aislado de *S. rolfsii* HAA se realizó el experimento de cultivo dual sin barrera con las condiciones experimentales ya descritas. Después de 5 días de incubación conjunta (Figura 49) en las cajas de Petri con los tratamientos el micelio del hongo no había cubierto por completo la placa, en contraste con el control, además se observa la inhibición en el crecimiento micelial en forma de ondas. A los 15 días después de la siembra, las cajas de Petri con los tratamientos muestran una disminución en la producción de esclerocios que a diferencia del control donde se observan esclerocios maduros, en los tratamientos los pocos esclerocios producidos aún se encuentran inmaduros. Para finalizar a los 30 días es clara la disminución en la producción de esclerocios debido al co-cultivo de los consorcios con el aislado de *S. rolfsii* HAA.

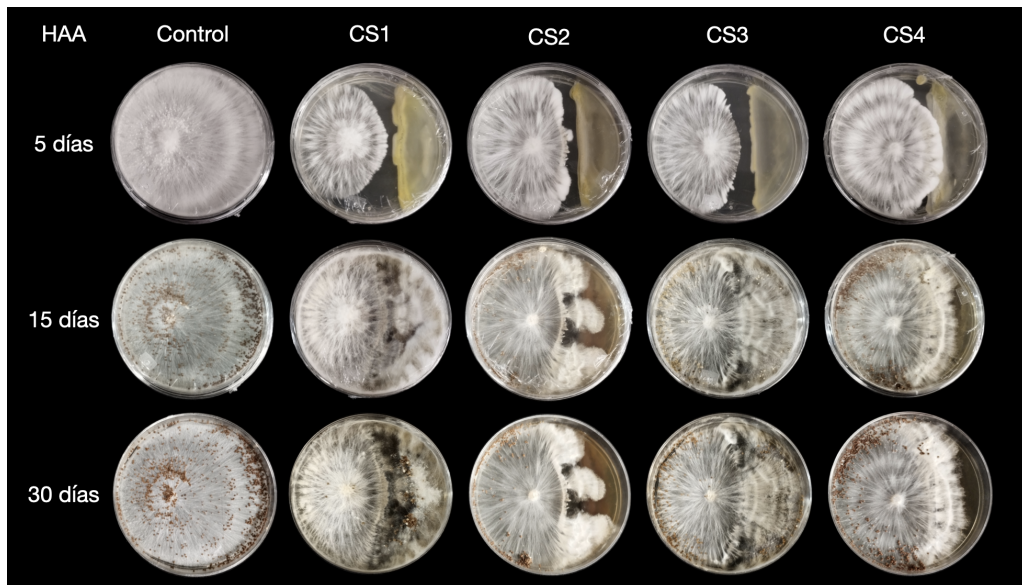


Figura 49: Prueba de confrontación entre los consorcios vs el aislado HAA de *S. rolfsii* por el método de cultivo dual.

Después de 7 días de incubación conjunta se determinó el porcentaje de inhibición en el crecimiento radial de micelio en dos direcciones verticales, sin abrir la placa (fórmula 4.5) (Tabla 20), en esta ocasión el tratamiento CS3 fue el que tuvo mayor efecto en la inhibición del crecimiento micelial con 39 %, seguido de CS2 con 38 %. A los 30 días de incubación conjunta los esclerocios se recolectaron y contaron para determinar el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios (fórmula 4.4) (Tabla 20), se encontró que el tratamiento CS3 inhibió la producción de esclerocios en el aislado de *S. rolfsii* HAA en un 76 %, además el promedio de esclerocios producidos por el aislado HAA (1338.5) superó a los producidos por el aislado AHE (362).

Se realizó el análisis estadístico con los datos recopilados de este experimento en cuanto a la inhibición en el crecimiento micelial radial (Figura 47) se encontró que a pesar de no presentar diferencias significativas (ANOVA, $p = 0,139$) al realizar la prueba Duncan y LSD con $p < 0,05$ los tratamientos CS2 y CS3 son diferentes respecto del control, es decir que existe un efecto negativo en el crecimiento micelial por medio del cultivo dual con estos dos tratamientos en el aislado de *S. rolfsii* HAA. Al analizar los

Tabla 20: Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en HAA por acción de los COVs y metabolitos difusibles de los consorcios microbianos

Tratamiento	Crecimiento radial (cm)		Producción esclerocios	
	Σ Micelio	% Inhibición	Σ Esclerocios	% IPE
Control	5.45	–	1338.5	–
CS1	3.77	31	400	70
CS2	3.38	38	433.33	68
CS3	3.33	39	318	76
CS4	3.6	34	409.66	69

datos de inhibición en la producción de esclerocios (Figura 48) se descubrió que existen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p = 0,0006$) y al compararlos contra el control todos los consorcios muestran diferencias significativas con $p < 0,005$ según la prueba de Tukey, con $p < 0,0005$ según la prueba de Duncan y con $p < 0,05$ según la prueba de LSD de Fisher, es decir que todos los consorcios disminuyeron significativamente la producción de esclerocios en el aislado HAA de *S. rolfsii*. Lo anterior se puede atribuir a la amplia variedad de metabolitos con actividad antifúngica que producen los aislados bacterianos presentes en los consorcios que incluyen enzimas líticas como quitinasas, lipasas, amilasas y proteasas, así como sideróforos, pigmentos de fenazinas y COVs como el ácido cianhídrico.

5.10 Efecto de los COVs secretados por los consorcios en la germinación y producción de esclerocios de *S. rolfsii* in vitro

En los ensayos anteriores se observó que existe un efecto negativo en el crecimiento micelial y producción de esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii* por efecto de los metabolitos difusibles y COVs producidos por los consorcios, para conocer el efecto de los COVs en la germinación de los esclerocios y posterior producción de esclerocios en los aislados de este fitopatógeno se realizó el siguiente experimento (Figura 50). En tubos de ensayo con AN en pico de flauta se sembraron cada uno de los consorcios por separado, el control se dejó sin inocular. Por otra parte, en una bolsa permeable se colocaron 15 esclerocios de uno de los aislados de *S. rolfsii* AHE (Figura 50, A) o HAA (Figura 50, B), cada bolsa fue situada en la parte superior del tubo de ensaye cerca de la tapa, además de cerrar los tubos estos se sellaron con una película de plástico para propiciar la acumulación de los COVs, se incubaron a 28 °C por 7 días.

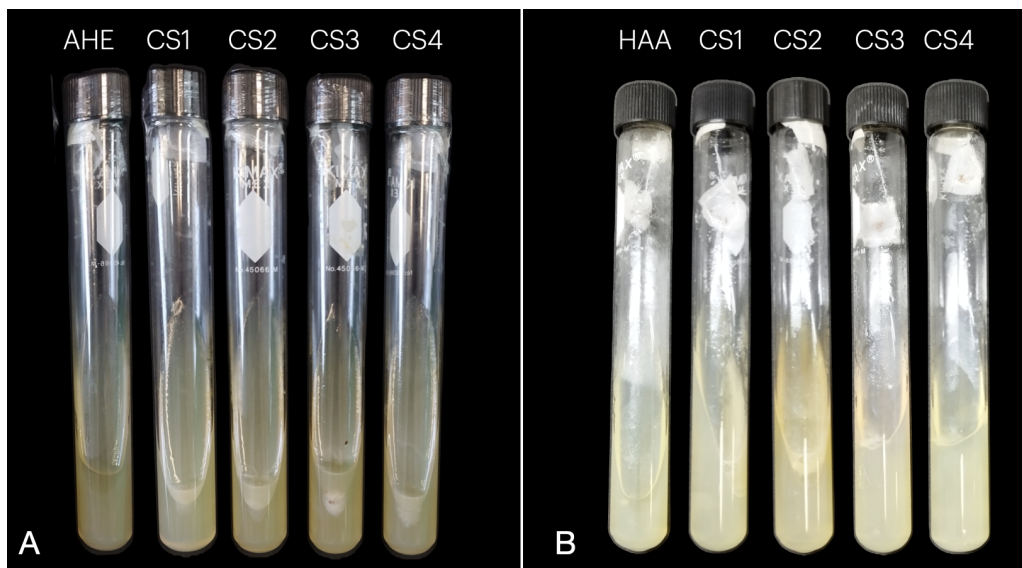


Figura 50: Efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios en el desarrollo de ambos aislados de *S. rolfsii* a los 7 días de incubación a 28 °C.

Los esclerocios expuestos a los COVs secretados por los consorcios se recuperaron después de siete días de incubación conjunta (Figura 51, A), enseguida ocho esclerocios provenientes de cada tratamiento fueron sembrados en placas de PDA e incubados a temperatura ambiente hasta por 30 días. Es importante destacar que cuando los esclerocios no fueron expuestos a los COVs secretados por los consorcios, es decir, que se encontraban en un tubo de ensayo sin inocular, estos germinaron aún dentro de las bolsas porosas (Figura 51, B), indicando un efecto negativo de los compuestos volátiles de los consorcios sobre la germinación de los esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii*.

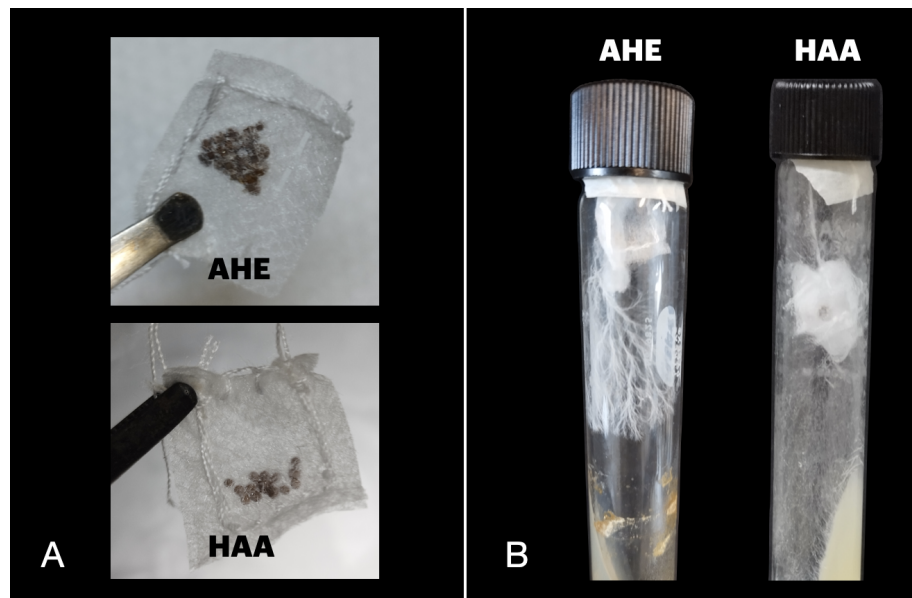


Figura 51: Los esclerocios se recuperaron de los tubos de ensayo. A.-Bolsas permeables con esclerocios parte superior AHE e inferior HAA. B.-En ambos aislados el control en ausencia de consorcios los esclerocios germinaron aún dentro de la bolsa después de 7 días de incubación a temperatura ambiente.

En el caso del aislado AHE de *S. rolfsii*, (Figura 52) posterior a 7 días de incubación algunos de los esclerocios que provenían de los tratamientos con los consorcios habían germinado, en contraste con los esclerocios procedentes del tubo de ensayo control, sin inocular, donde todos los esclerocios sembrados habían germinado, cabe destacar que dichos esclerocios no solo habían germinado, sino que además ya habían producido escle-

5.10. EFECTO DE LOS COVS SECRETADOS POR LOS CONSORCIOS EN LA GERMINACIÓN

Tabla 21: Porcentaje de germinación de los esclerocios del aislado AHE de *S. rolfsii* expuestos a los COVs secretados por los consorcios

Tratamiento	% Germinación
Control	93.75
CS1	12.5
CS2	3.13
CS3	18.75
CS4	3.13

rocios. Después de 30 días de incubación los esclerocios en algunos de los tratamientos no germinaron, lo que indica un efecto negativo en la germinación debido a los COVs secretados por los consorcios.

A los siete días de incubación se determinó el porcentaje de germinación (fórmula 4.6) de los esclerocios derivados de los tratamientos y control (Tabla 21). Los tratamientos disminuyeron la germinación de los esclerocios en diferentes porcentajes con CS3 solo el 18.75 % de los esclerocios germinó, con CS1 el 12.5 %, mientras que CS2 y CS4 solo el 3.13 % de los esclerocios sembrados en placas de PDA germinó después de ser expuestos a los COVs producidos por los consorcios, por lo que existe un efecto negativo en la germinación de los esclerocios en este aislado del fitopatógeno, en concordancia con lo anterior se ha reportado que la producción de HCN en la cepa de *Pseudomonas monteilii* 9 mostró actividad antifúngica contra *S. rolfsii* [57]. Como se señaló anteriormente, sección 5.6.1 y 5.6.3, la mayoría de los aislados que conforman los consorcios produce HCN, por lo que este metabolito potencialmente es el responsable del efecto observado. Al realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos respecto a la germinación de los esclerocios se encontró que existen diferencias estadísticas significativas (Kruskal-Wallis, $p = 0,019$) al comparar los tratamientos con el control (Figura 53).

Después de 30 días de incubación de las placas con los esclerocios expuestos a COVs secretados por los consorcios microbianos, se recuperaron y se contaron los esclerocios para determinar el porcentaje de inhibición en la producción de éstos (fórmula 4.4) (Ta-

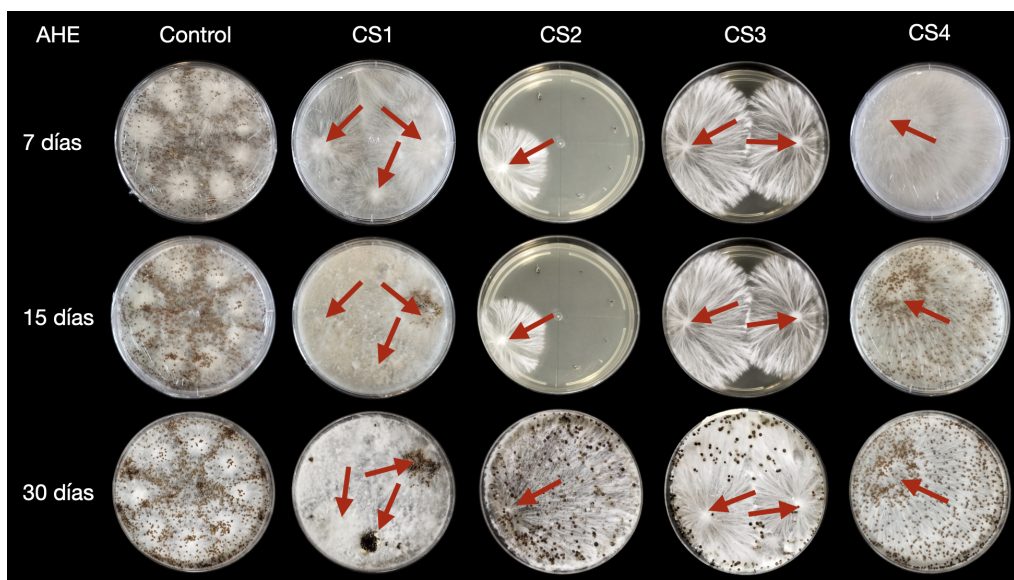


Figura 52: Efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios en la germinación de los esclerocios del aislado AHE. Placas de PDA incubadas a temperatura ambiente por hasta 30 días. Las flechas indican los esclerocios germinados.

bla 22). Se observó que todos los tratamientos disminuyeron la producción de esclerocios desde un 67 % con CS4 hasta un 94 % con CS1. Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos (Figura 54), a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticas significativas (Kruskal-Wallis, $p = 0,096$), al comparar por pares se encontraron diferencias significativas (Duncan, $p < 0,04$ y LSD $p < 0,05$) en los tratamientos CS1 y CS2, por lo que, se concluye que los compuestos volátiles producidos por los consorcios tienen un efecto negativo sobre la germinación y la producción de esclerocios en el aislado de *S. rolfsii* AHE.

Tabla 22: Porcentaje de inhibición de la producción de esclerocios en el aislado AHE por acción de los COVs secretados por los consorcios

Tratamientos	Σ Esclerocios	% IPE
Control	852.50	-
CS1	45.50	94
CS2	87.50	89
CS3	269.25	68
CS4	283.25	67

5.10. EFECTO DE LOS COVS SECRETADOS POR LOS CONSORCIOS EN LA GERMINACIÓN

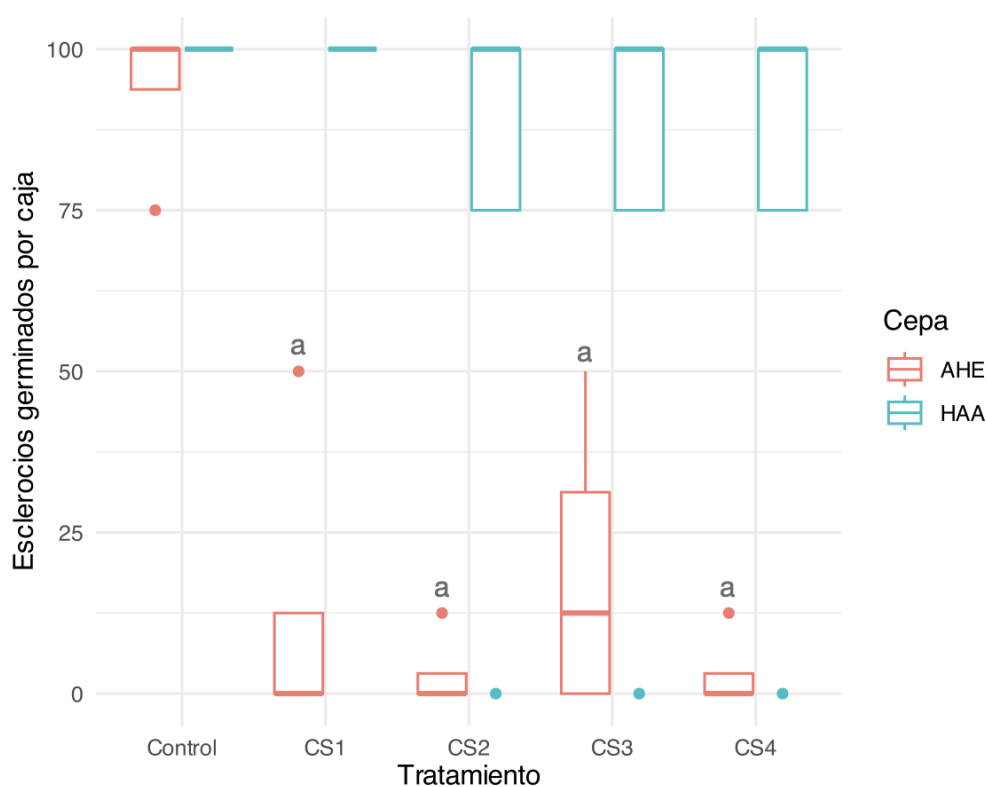


Figura 53: Efecto de los compuestos volátiles secretados por los consorcios en la germinación de los esclerocios en ambas cepas de *S. rolf sii*. Diferencias significativas según la prueba de Duncan a: $p < 0,000$.

Cabe mencionar que los consorcios están formados por varios aislados de especies del género *Pseudomonas*, se ha reportado que este tipo de bacterias es capaz de sintetizar una gran variedad de COVs como: alquenos (1-buteno, 1-deceno, 3-noneno, 1-undeceno, entre otros), cetonas (2-undecanona y 2-nonanona), terpenos (limoneno), compuestos orgánicos que contienen azufre (dimetil disulfuro), compuestos orgánicos que contienen nitrógeno (2-amino-acetofenona y pirazinas), además de HCN [45]. Algunos de los COVs de origen bacteriano tienen propiedades antifúngicas, pueden afectar el crecimiento, diferenciación, desarrollo y producción de metabolitos secundarios de los hongos, las mezclas de COVs producidos por cepas de *P. chlororaphis* 449, *P. fluorescens* B-4117, *Serratia plymuthica* IC1270 y *Serratia proteamaculans* 94 mostraron un efecto fungistático contra hongos fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Helminthosporium sativum* y *Rhizoctonia solani*, en este último el efecto fue más pronunciado y las cepas de *Pseudomonas* fueron

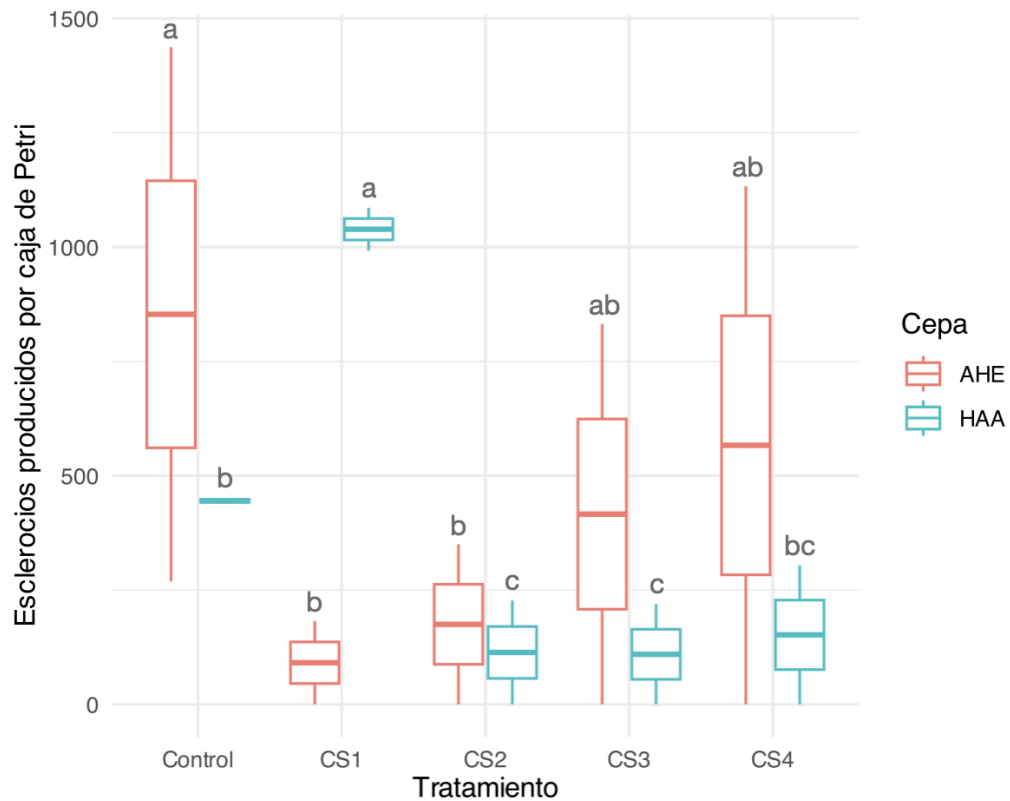


Figura 54: Inhibición en la producción de esclerocios de los esclerocios en ambas cepas de *S. rolfsii* expuestos a los compuestos volátiles secretados por los consorcios. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba LSD de Fisher $p < 0,05$.

las más activas [55].

Para ensayar el efecto de los COVs secretados por los consorcios en la germinación y posterior producción de esclerocios en el aislado de *S. rolfsii* HAA se realizó el experimento en tubo de ensayo con las condiciones experimentales antes mencionadas (Figura 55). En los tratamientos CS2 y CS3 ninguno de los 8 esclerocios germinó incluso después de 30 días de incubación, sin embargo, esto no se mantuvo en todas las ocasiones. Con los tratamientos CS2, CS3 y CS4 el porcentaje de germinación disminuyó en un 25 % ya que hasta el 75 % de los esclerocios expuestos a los COVs producidos por los consorcios germinaron, mientras que el 100 % de los esclerocios germinaron con el tratamiento CS1 en este aislado del fitopatógeno (Tabla 23).

5.10. EFECTO DE LOS COVS SECRETADOS POR LOS CONSORCIOS EN LA GERMINACIÓN

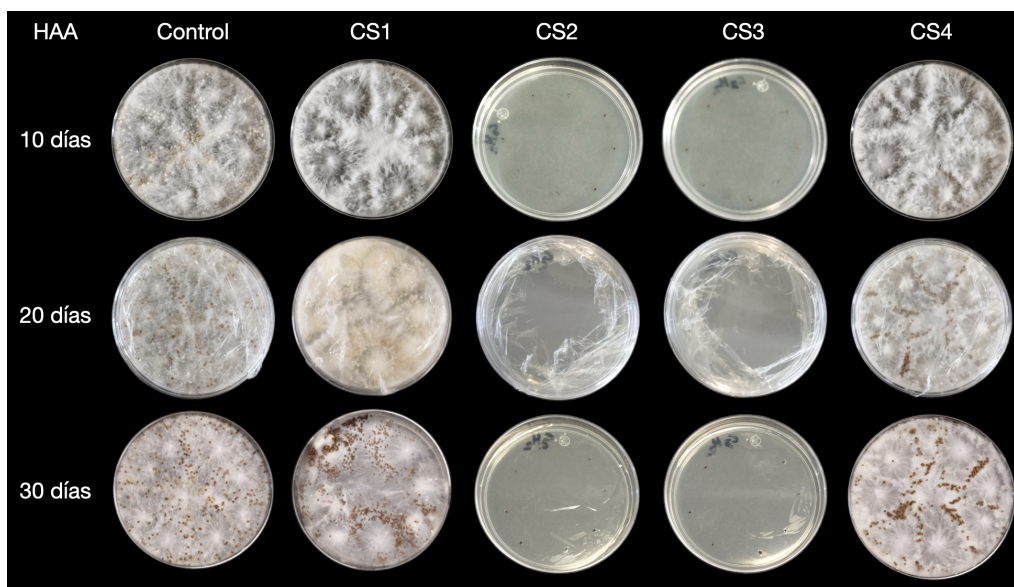


Figura 55: Efecto de los compuestos volátiles producidos por los consorcios en la germinación de los esclerocios del aislado HAA. Placas con PDA incubadas a temperatura ambiente hasta por 30 días.

Tabla 23: Porcentaje de germinación de los esclerocios del aislado HAA expuestos a los compuestos volátiles producidos por los consorcios

Tratamiento	% Germinación
Control	100
CS1	100
CS2	75
CS3	75
CS4	75

Porcentaje de germinación de los esclerocios del aislado HAA expuestos a los compuestos volátiles producidos por los consorcios en cada una de las repeticiones de las dos réplicas que se realizaron.

Al realizar el análisis estadístico de los datos se encontró que en el caso del aislado de *S. rolfsii* HAA no existen diferencias significativas entre los tratamientos comparados con el control, según la prueba de Kruskal-Wallis $p = 0,692$ (Figura 53), por lo que no hay un efecto en la germinación de los esclerocios expuestos a los COVs secretado por los consorcios.

Posteriormente a los 30 días de incubación los esclerocios producidos en los tratamientos fueron recuperados y contados para determinar el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios (fórmula 4.4) (Tabla 24). El tratamiento CS3 disminuyó la producción de esclerocios en 77.87 %, CS2 en un 77 % y CS4 en 69.29 %, mientras que los esclerocios expuestos a los compuestos volátiles del consorcio CS1 aumentó la producción de esclerocios comparado con el control, ya que en promedio CS1 produjo 1039 y el control 495 este resultado no se había observado en ninguno de los demás experimentos. El promedio de producción de esclerocios en el aislado HAA fue el más bajo en comparación con los experimentos anteriores. A pesar de que los COVs producidos por los consorcios no mostraron un efecto en la germinación de los esclerocios del aislado de *S. rolfsii* HAA si disminuyeron la producción de éstos, al igual que en aislado AHE. Hasta nuestros resultados sugieren que existe un efecto negativo en la producción de esclerocios debido a las mezclas de COVs secretados por los consorcios, cuya composición química desconocemos, para ello se requiere mayor investigación respecto a la identidad de dichos compuestos.

Tabla 24: Porcentaje de inhibición de la producción de esclerocios en el aislado HAA por acción de los COVs secretados por los consorcios

Tratamientos	Σ Esclerocios	% IPE
Control	495	-
CS1	1039	-
CS2	113.5	77
CS3	109.5	77.87
CS4	152	69.29

Se realizó el análisis estadístico de los datos de producción de esclerocios del aislado de *S. rolfsii* HAA expuestos a los COVs de los consorcios (Figura 54) se encontró que presentan diferencias significativas (ANOVA, $p = 0,005$) donde los tratamientos CS2 y CS3 son estadísticamente diferentes del control. Aunque en este experimento no se observó inhibición en la germinación de los esclerocios en aquellos expuestos a los COVs sí

5.10. EFECTO DE LOS COVS SECRETADOS POR LOS CONSORCIOS EN LA GERMINACIÓN

se observó la inhibición en la producción de esclerocios en el aislado de *S. rolfsii* HAA a diferencia del aislado AHE donde este mismo experimento se encontraron diferencias significativas tanto en la germinación como en la producción de esclerocios, por lo que, los compuestos volátiles producidos por los consorcios tienen un efecto negativo en la producción de esclerocios en ambos aislados del hongo fitopatígeno, sobre todo en lo que se refiere a los consorcios CS2 y CS3, esto se debe potencialmente al tipo de COVs sintetizados por los diferentes aislados bacterianos que conforman cada consorcio. Las mezclas de COVs microbianos dependen de varios factores como la temperatura, el sustrato, la presencia de otros microorganismos, la radiación, así como el tipo de ecosistema, por otra parte, aún no se comprenden del todo las vías de biosíntesis de COVs microbianos [45], por lo que se necesita una investigación más profunda.

5.10.1. Análisis comparativo de los resultados de los experimentos de cultivo dual

En los cuatro experimentos anteriores: antibiosis por el método del papel celofán, cultivo dual con barrera física, sin barrera y en tubo de ensayo se demostró que En los cuatro experimentos anteriores se demostró que existe un efecto inhibitorio en la producción de esclerocios en los aislados del hongo fitopatígeno debido a la interacción con los consorcios bacterianos, a continuación se muestra una comparación de los resultados de los cuatro experimentos en cuanto al promedio en la producción de esclerocios (Figura 56), como se puede observar que en el caso del aislado de *S. rolfsii* AHE todos los tratamientos presentan diferencias estadísticas significativas (Kruskal-Wallis, $p = 0,024$) al compararlas contra el control, sin embargo en el caso del aislado HAA el consorcio CS1 no muestra diferencias significativas respecto del control (Figura 56) a diferencia de los consorcios CS2, CS3 y CS4 que son estadísticamente diferentes al control (ANOVA, $p = 0,032$). Para los siguientes experimentos se eligieron los consorcios CS3 y CS4 porque fueron los que mostraron mayor potencial antagónico contra *S. rolfsii*, a pesar de que CS2 también mostró potencial los aislados bacterianos que conforman dicho consorcio

también se encuentran en el consorcio CS4, y el consorcio CS1 se descartó por no ser tan efectivo contra *S. rolfsii* HAA.

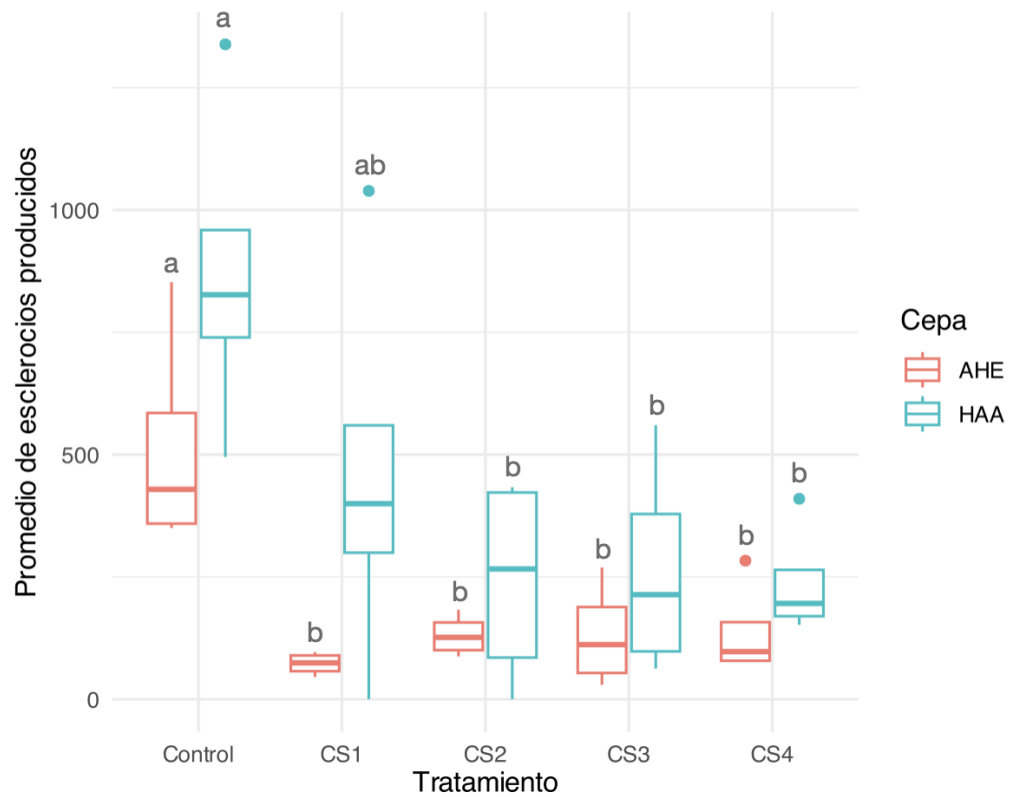


Figura 56: Promedio de producción de esclerocios en los experimentos de antagonismo en ambas cepas de *S. rolfsii*. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba LSD de Fisher $p < 0,05$.

5.11 Impacto en la germinación de los esclerocios de ambos aislados de *S. rolfsii* debido a los filtrados libres de células de los consorcios

Hasta ahora encontramos que tanto los metabolitos difusibles en el medio de cultivo como los COVs producidos por los consorcios tienen un efecto antagónico contra dos aislados del hongo fitopatógeno *S. rolfsii*, el siguiente experimento fue realizado para analizar el efecto de los metabolitos secundarios producidos por los consorcios en un cultivo sumergido, dado que los experimentos anteriores se realizaron en medio sólido. Para ello, se crecieron los consorcios en CN, se incubaron en agitación constante durante 96 h a 28 °C (sección 4.8) enseguida se eliminaron las células y se utilizó solamente el filtrado libre de células (FLC) para preparar cajas de Petri con PDA, se empleó agua destilada como control negativo, mientras que, como control positivo se usó el fungicida de contacto comercial Captan (compuesto activo) que tiene efecto contra varios hongos fitopatógenos entre ellos *S. rolfsii* [5]. Posterior a los 30 días después de la siembra del disco de micelio con crecimiento activo del hongo se determinó que la dosis para inhibir el crecimiento micelial para el aislado de *S. rolfsii* AHE fue de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para el aislado HAA fue de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en este caso, aunque si hay crecimiento de micelio, cubrió la caja de Petri, no hubo producción de esclerocios (Figura 57).

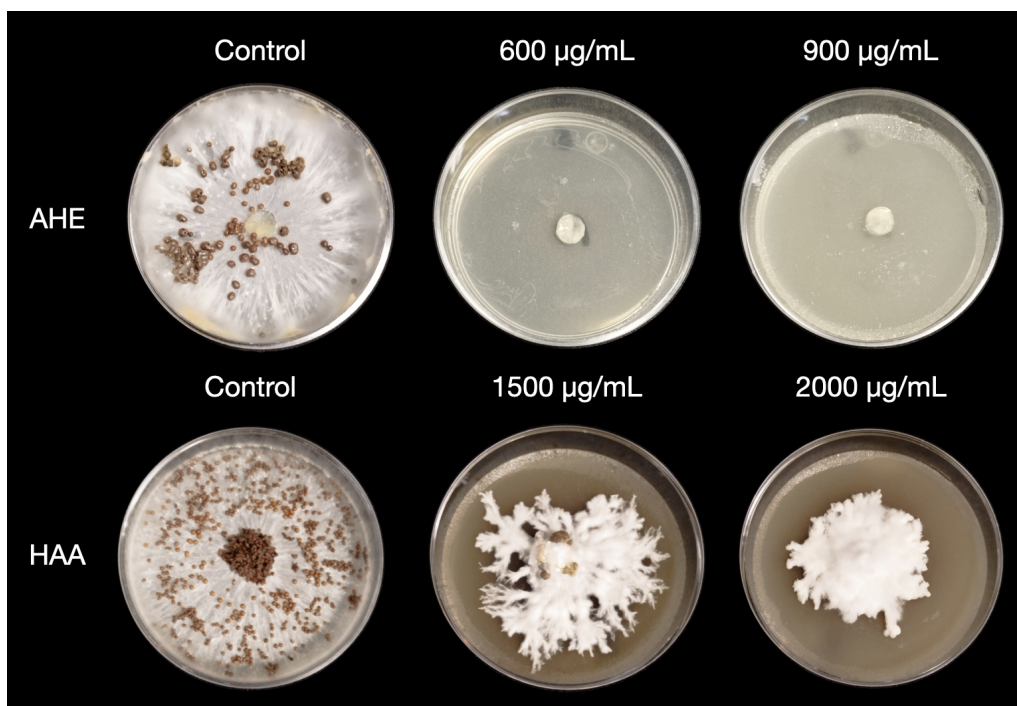


Figura 57: Inhibición en el crecimiento de micelio en ambos aislados de *S. rolfsii* con el fungicida comercial Captan suplementado al PDA, las placas se incubaron por 30 días. Se realizaron dos réplicas biológicas con una repetición.

Para el aislado de *S. rolfsii* AHE los FCL de los consorcios CS3 y CS4 tuvieron un efecto inhibitorio tanto en el crecimiento de micelio como en la producción de esclerocios (Figura 58), como se observa en las placas en donde se encuentran los filtrados libres de células de los consorcios no creció el micelio incluso a los 30 días después de la siembra del disco de micelio a diferencia del control que a los siete días ya había llenado la caja de Petri con PDA con agua destilada como control negativo, el efecto antagónico de los filtrados fue mayor que el efecto del fungicida comercial Captan a $600 \mu\text{g/mL}$ ya que a los siete días el micelio había llenado más del 80 % de la caja de Petri.

Después de siete días de incubación se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio de cada uno de los tratamientos comparados con el control (fórmula 4.5), a los 30 días de incubación se recolectaron los esclerocios producidos en los tratamientos y se contaron para determinar el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios respecto del control (fórmula 4.4) (Tabla 25). Los filtrados libres de células

5.11. IMPACTO EN LA GERMINACIÓN DE LOS ESCLEROCIOS DE AMBOS AISLADOS DE S.

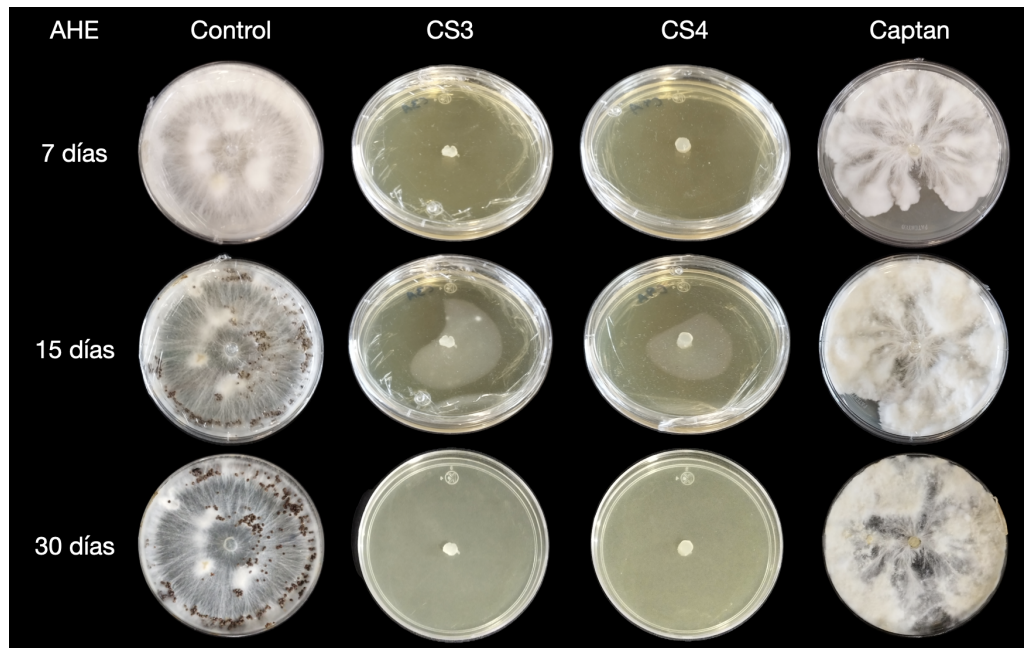


Figura 58: Efecto de los filtrados libres de células en el crecimiento de micelio y producción de esclerocios en AHE. Se realizaron dos réplicas biológicas con una repetición, las placas se incubaron a temperatura ambiente por 30 días, se utilizaron 600 µg/mL del fungicida comercial Captan.

de los consorcios CS3 y CS4 inhibieron en mayor porcentaje el crecimiento de micelio en el aislado AHE, CS3 en 60 % y CS4 en 100 % a diferencia del fungicida Captan que solo logró inhibir en un 15 % el crecimiento de micelio en comparación con el control, por lo cual los FCL de los consorcios mostraron ser más efectivos que el fungicida comercial para inhibir el crecimiento micelial en este aislado del fitopatógeno en condiciones de laboratorio.

Desde los finales de los años 70s se comenzaron a investigar intensamente agentes de biocontrol especialmente los grupos de *P. fluorescens* y *P. putida* que han sido utilizados para tratar las marchiteces causadas por *Fusarium* en varias especies de plantas el principal mecanismo de biocontrol que tienen las Pseudomonas es la producción de metabolitos antibióticos como sideróforos y HCN [43], estos metabolitos son producidos por varios de los aislados bacterianos que se forman los consorcios lo que podría explicar el efecto

Tabla 25: Porcentaje de inhibición micelial e IPE en AHE debido a los FCL de los consorcios y el fungicida Captan

Tratamiento	Inhibición micelio		Inhibición esclerocios	
	Σ Micelio	% Inhibición	Σ Esclerocios	% IPE
Control	4.45	–	240.86	–
CS3	1.78	60	26.75	88
CS4	0	100	0	100
Fungicida	3.75	15	176.33	26.79

de los FCL sobre el crecimiento de micelio en el aislado de *S. rolfsii* AHE.

También se observó una disminución en la producción de esclerocios del 88 % con el filtrado libre de células de CS3 y en un 100 % con el de CS4, mientras que el fungicida redujo la producción de esclerocios en un 26.79 %, otra observación en este experimento es que el control de AHE produjo menos esclerocios al compararlos con los experimentos anteriores. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente (Figura 59) y se encontraron diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p = 0,008$) al realizar la prueba por pares LSD de Fisher con $p < 0,05$ se concluyó que esas diferencias se encuentran al comparar los FCL de los consorcios con el control, lo que implica que los FCL de los consorcios fueron efectivos para inhibir la producción de esclerocios en aislado AHE, la mezcla de metabolitos secretados por las bacterias que conforman los consorcios en el medio de cultivo tuvo un efecto negativo sobre el desarrollo del hongo.

Los FCL de ambos consorcios fueron probados también en el aislado del hongo HAA (Figura 60) donde se observa que los filtrados inhibieron por completo el crecimiento de micelio en este aislado de *S. rolfsii* incluso a los 30 días después de la siembra del disco de micelio y que tuvieron un mayor efecto que el fungicida comercial al igual que con el aislado AHE, a los siete después de la siembra del disco de micelio el control que creció en una placa de PDA ya había llenado por completo la placa con un tapete de micelio espeso donde se aprecia los inicios del esclerocio.

5.11. IMPACTO EN LA GERMINACIÓN DE LOS ESCLEROCIOS DE AMBOS AISLADOS DE S.

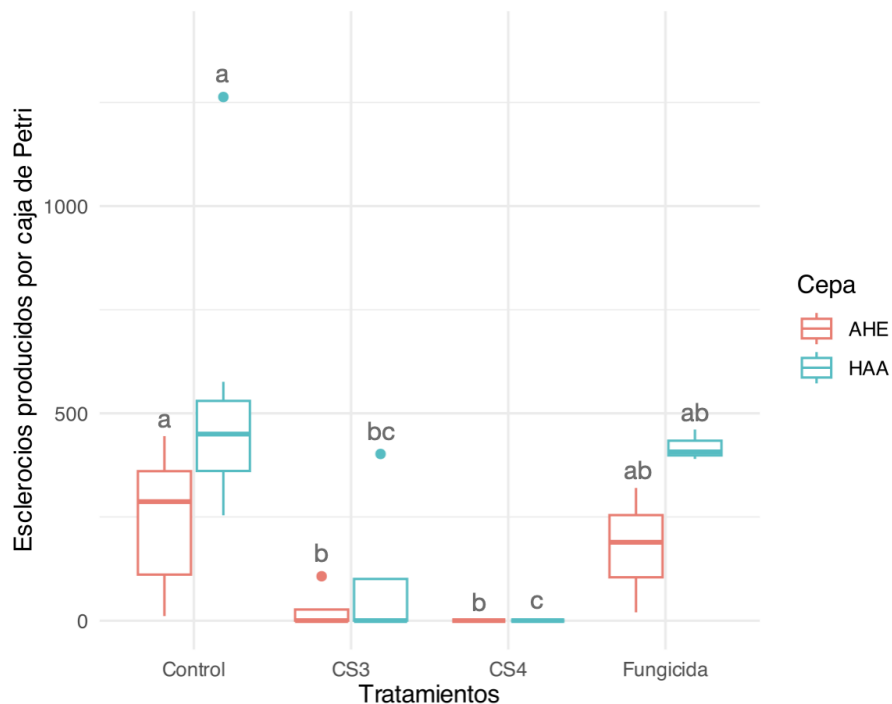


Figura 59: Inhibición en la producción de esclerocios en ambas cepas de *S. rolf sii* debido a los filtrados libres de células y el fungicida Captan. Los tratamientos que tienen diferencias estadísticas significativas según la prueba de LSD de Fisher $p < 0,05$ se muestran con letras diferentes.

A los siete de días después de la siembra del disco de micelio en las placas con los FCL de los consorcios se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio (fórmula 4.5), el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios se calculó a los 30 días de incubación (fórmula 4.4) (Tabla 26). Los FCL de ambos consorcios CS3 y CS4 mostraron un mayor porcentaje de inhibición tanto del crecimiento de micelio como de la producción de esclerocios que el fungicida Captan. El filtrado del consorcio CS4 obtuvo el porcentaje de inhibición más alto pues inhibió al 100 % el desarrollo del hongo, seguido del CS3 con 71.30 % de inhibición del crecimiento de micelio y 81.23 % de inhibición en la producción de esclerocios. Como ya se mencionó el grupo de las *Pseudomonas* puede suprimir enfermedades en las raíces de las plantas causadas por hongos debido a la batería de metabolitos que sintetiza entre ellos enzimas líticas, antibióticos solubles, péptidos no ribosómicos, HCN, entre otros [111], los consorcios utilizados en esta investigación

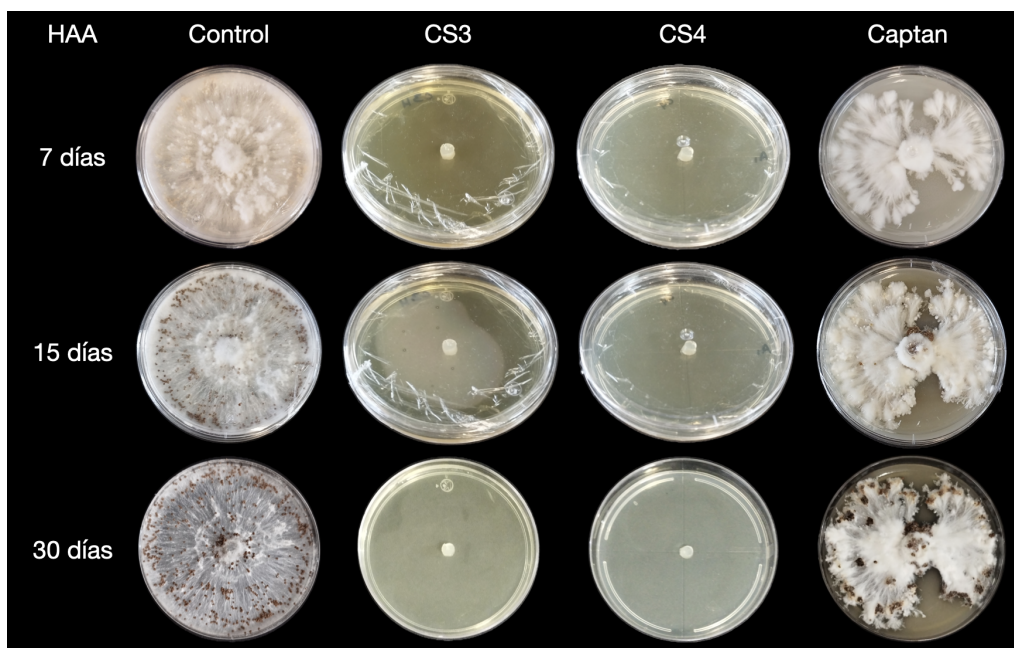


Figura 60: Efecto de los filtrados libres de células en el crecimiento micelial y producción de esclerocios en HAA. Se realizaron dos réplicas biológicas con una repetición, las placas se incubaron a temperatura ambiente por 30 días se utilizaron $2000 \mu\text{g/mL}$ del fungicida comercial Captan.

están formados con aislados de *Pseudomonas* y se comprobó que producen este tipo de metabolito con actividad antifúngica por lo que es muy probable que el efecto observado se deba a esto.

Tabla 26: Porcentaje de inhibición micelial y de producción de esclerocios en HAA por acción de los filtrados libres de células y el fungicida

Tratamiento	Inhibición micelio		Inhibición esclerocios	
	Σ Micelio	% Inhibición	Σ Esclerocios	% IPE
Control	4.46	–	535.57	–
CS3	1.28	71.30	100.50	81.23
CS4	0	100	0	100
Fungicida	3.65	18	419.33	21.70

Al realizar el análisis estadístico de los datos de producción de esclerocios obtenidos en este ensayo (Figura 59) se observó que existen diferencias significativas (ANOVA,

5.11. IMPACTO EN LA GERMINACIÓN DE LOS ESCLEROCIOS DE AMBOS AISLADOS DE *S.*

$p = 0,01$) entre el control y los tratamientos, al comparar por pares mediante la prueba LSD de Fisher $p < 0,05$ se encontró que la producción de esclerocios en el aislado de *S. rolfsii* HAA sembrado en la caja de Petri con el filtrado libre de células del consorcio CS4 es estadísticamente diferente respecto de los esclerocios producidos en el control. Cabe destacar que el filtrado de CS3 también presenta diferencias significativas respecto al control, aunque no con el fungicida en cuanto a la producción de esclerocios, es decir, que con los dos filtrados de los consorcios hay un efecto negativo en la producción de esclerocios siendo superior el efecto con el filtrado del consorcio CS4.

La variedad de metabolitos secretados por cada uno de los aislados que forman los consorcios es extensa esto como resultado de la interrelación y comunicación entre los miembros de la comunidad microbiana artificial que se construyó para esta investigación, es de suma importancia estudiar la composición de los FCL de los consorcios empleados, aunque el perfil antagónico y promotor del crecimiento vegetal presentado permite vislumbrar que se basa en la producción de metabolitos con actividad antibiótica como los pigmentos de fenazinas, sideróforos, HCN y otros COVs.

Los FCL de los consorcios fueron utilizados también para conocer el efecto sobre la germinación de los esclerocios de ambos aislados de *S. rolfsii*. En las mismas condiciones experimentales ya descritas se hicieron cajas de Petri con PDA y los FCL de los consorcios CS3 y CS4, para este experimento se colocaron ocho esclerocios de manera equidistante con cada uno de los aislados del fitopatógeno. En el caso del aislado de *S. rolfsii* AHE después de 7 días incubación (Figura 61) se observó que en las placas que contienen los FCL de los consorcios ninguno de los esclerocios germinó en contraste de los esclerocios sembrados en las placas con el fungicida Captan a $600 \mu\text{g/mL}$ y las placas control donde el micelio de los esclerocios ya había cubierto por completo la caja, para los 15 días posteriores a la siembra los esclerocios del control y de las placas con el fungicida comercial ya tenía esclerocios en comparación con las placas de los tratamientos en donde los esclerocios no germinaron incluso después de 30 días de incubación.

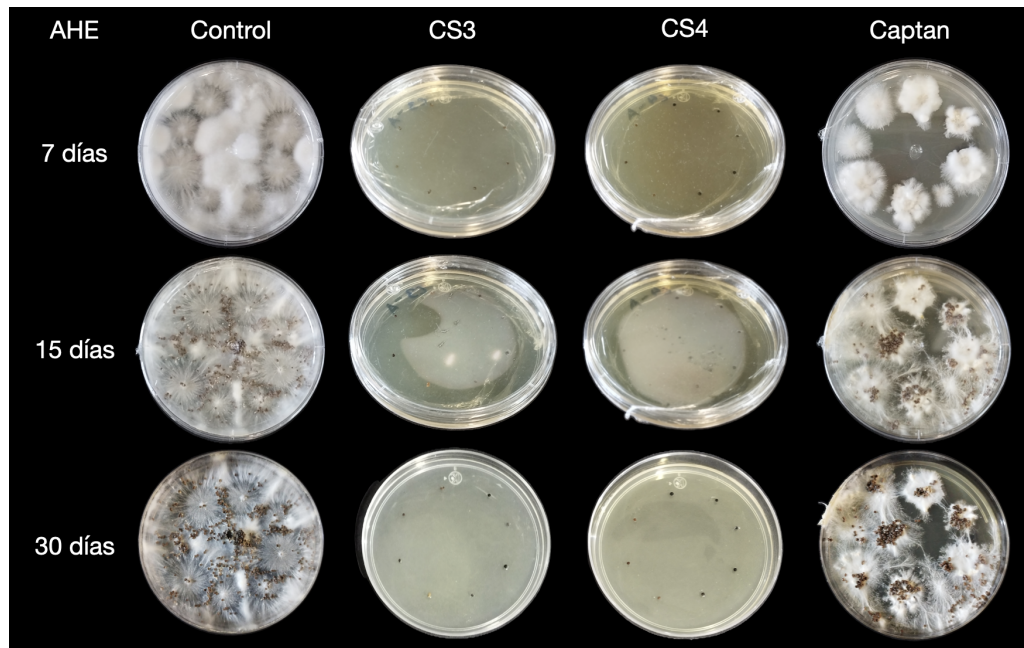


Figura 61: Efecto de los filtrados libres de células en la germinación y producción de esclerocios en AHE. Se realizaron dos réplicas biológicas con una repetición, las placas se incubaron a temperatura ambiente por 30 días, se utilizaron 600 $\mu\text{g/mL}$ del fungicida comercial Captan.

Después de 30 días de incubación los esclerocios producidos en los tratamientos se recolectaron y contaron para determinar el efecto en la producción de esclerocios (fórmula 4.4). Se encontró que el FCL de CS3 disminuye la producción de esclerocios en 88 % y el de CS4 en un 100 %, mientras que el fungicida solo disminuyó la producción de esclerocios en un 26.79 % comparado con el control en aislado de *S. rolfsii* AHE, se realizó el análisis estadístico y se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control (Kruskal-Wallis, $p = 0,001$) al comparar por pares (LSD de Fisher, $p < 0,05$) se observó que el mejor desempeño en cuanto a la disminución en la producción de esclerocios fue obtenido por los FCL de los consorcios CS3 y CS4 al compararlos incluso con el fungicida Captan (Figura 62). Los FCL de ambos consorcios no solo inhibieron la germinación del *S. rolfsii* AHE, sino que además disminuyeron la producción de esclerocios por lo que potencialmente estos consorcios pueden ser utilizados para combatir el tizón sureño que afecta muchas especies de plantas.

5.11. IMPACTO EN LA GERMINACIÓN DE LOS ESCLEROCIOS DE AMBOS AISLADOS DE *S. rolfsii*

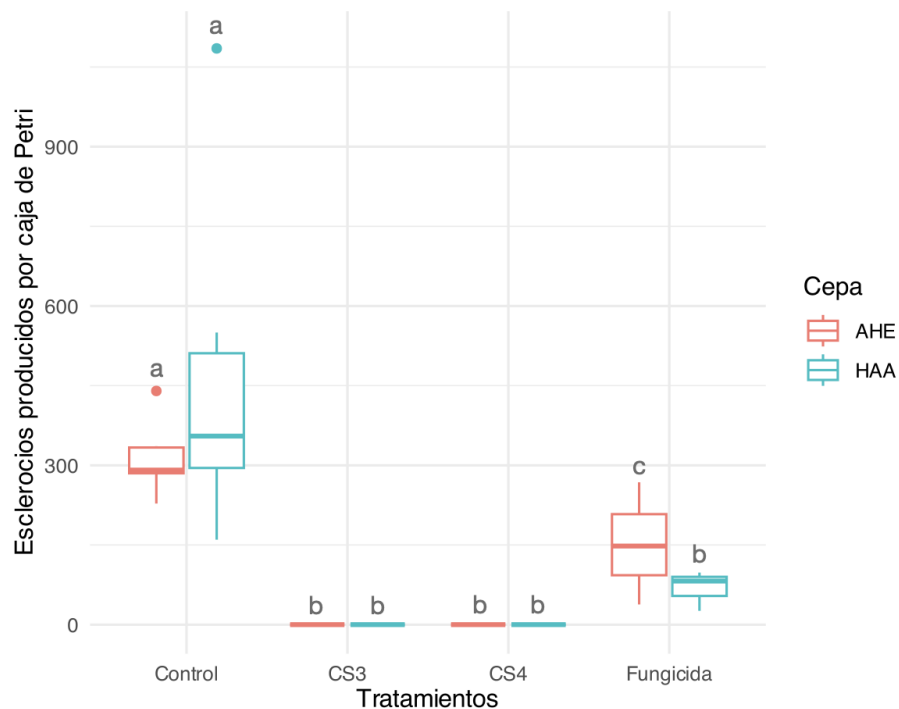


Figura 62: Inhibición en la producción de esclerocios en ambas cepas de *S. rolfsii* debido a los filtrados libres de células y el fungicida Captan. Los tratamientos que tienen diferencias estadísticas significativas según la prueba de LSD de Fisher $p < 0,05$ se muestran con letras diferentes.

Para determinar el efecto de los FCL sobre la germinación de los esclerocios en el aislado de *S. rolfsii* HAA se realizó el ensayo con cultivo sumergido donde se sembraron ocho esclerocios de manera equidistante (figura 63) al igual que con el aislado AHE los esclerocios no germinaron después de siete días de incubación a diferencia de los esclerocios sembrados en cajas que contenían el fungicida Captan a $2000 \mu\text{g/mL}$ y el control que inclusive muestra los inicios del esclerocios, es decir, la acumulación de hifas. Después de 30 días de incubación los esclerocios sembrados en placas con los FCL de los consorcios CS3 y CS4 no germinaron. El filtrado libre de célula del consorcio CS4 logró inhibir en 100 % la germinación de los esclerocios del aislado HAA de *S. rolfsii*.

A los 30 días posteriores a la siembra se recuperaron los esclerocios producidos en los tratamientos y se contaron para calcular el porcentaje de inhibición en la producción de esclerocios (fórmula 4.4). Se encontró que el FCL del CS3 disminuyó la producción

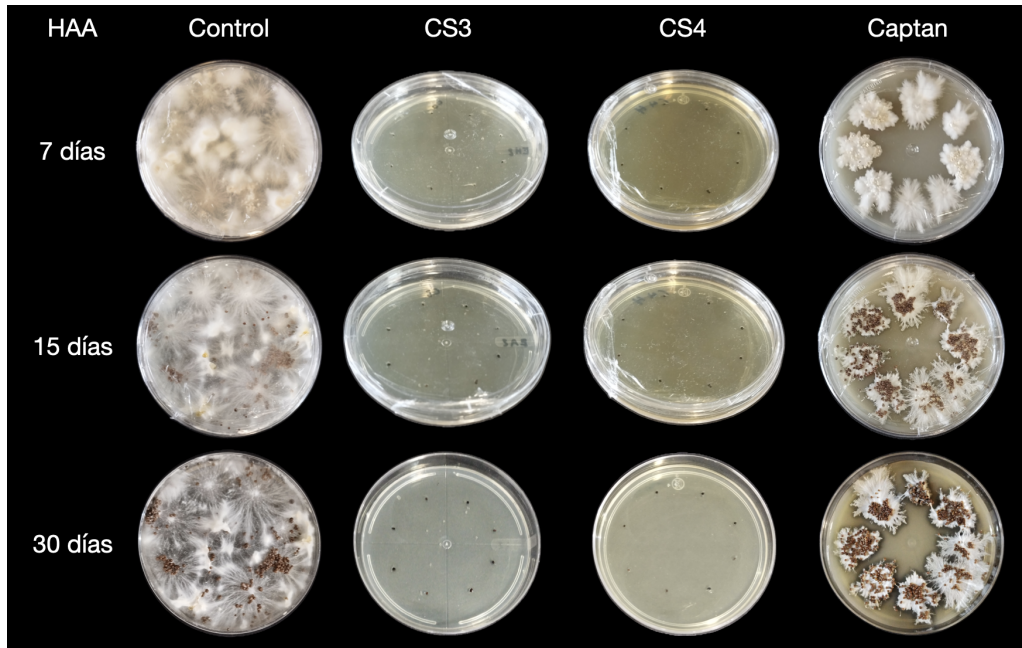


Figura 63: Efecto de los filtrados libres de células en la germinación y producción de esclerocios en HAA. Se realizaron dos réplicas biológicas con una repetición, las placas se incubaron a temperatura ambiente por 30 días, se utilizaron 2000 $\mu\text{g/mL}$ del fungicida comercial Captan.

de esclerocios en 81 % en el aislado de *S. rolfsii* HAA, mientras que el fungicida solo redujo la producción de esclerocios en 21.70 % en comparación con el control, el FCL de CS4 inhibió al 100 % la germinación por lo que no hubo producción de esclerocios mostrando el gran potencial de este consorcio para el biocontrol de *S. rolfsii*. Se realizó el análisis estadístico con los datos obtenidos de la producción de esclerocios (Figura 62), se encontró que el fungicida al igual que los filtrados de los consorcios disminuyeron la producción de esclerocios y que son estadísticamente diferentes del control (Kruskal-Wallis, $p = 0,001$), al comparar por pares se determinó mediante la prueba LSD de Fisher con $p < 0,05$ que los tratamientos inhibieron la producción de esclerocios respecto del control. Con este experimento se verificó que los metabolitos secundarios producidos por los consorcios tienen un efecto negativo sobre el crecimiento de micelio y la producción de esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii*.

Los principales modos de acción que las *Pseudomonas* poseen para el biocontrol de

5.11. IMPACTO EN LA GERMINACIÓN DE LOS ESCLEROCIOS DE AMBOS AISLADOS DE S.

patógenos son tres, la competencia con el patógeno por los nutrientes y el nicho, la interacción directa a través de la antibiosis y la interacción con la planta huésped por medio de la inducción de resistencia [89]. Para investigar si las bacterias que forman los consorcios antagonizan a los aislados de *S. rolfsii* mediante la producción de metabolitos extracelulares se realizaron los FCL, en investigaciones recientes extrajeron filtrados libres de células de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* ALEB 7B utilizando diferentes solventes orgánicos como el acetato de etilo, n-butanol y diclorometano (DCM), los extractos con este último solvente fueron los únicos en mostrar un efecto antagónico contra una cepa de *S. rolfsii* SY4, posteriormente utilizaron los extractos con DCM para realizar una cromatografía acoplada a una espectrometría de masas para identificar los componentes de los extractos e identificaron compuestos con actividad antimicrobiana como el ácido indol acético y 2-piperidinona, además de 1-undeceno y dimetil disulfuro como principales componentes de COVs producidos por la cepa de *P. fluorescens* [112]. En este mismo sentido en otra investigación utilizaron extractos con metanol y acetato de etilo de filtrados libres de células de cultivos de la cepa de *Pseudomonas chlororaphis* zm-1 por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) y confirmaron que los componentes principales del extracto, que juegan un papel clave en la inhibición de *S. rolfsii*, son diferentes compuestos de fenazina como ácido fenazina-1-carboxílico y 1-hidroxi fenazina [89]. Por lo que la naturaleza de los metabolitos producidos en los FCL de los consorcios debe ser investigado a profundidad, ya que bajo las condiciones experimentales de este estudio se observó un efecto negativo contra los aislados de *S. rolfsii*, además se demostró que los aislados que forman los consorcios producen desde enzimas líticas, AIA, HCN, sideróforos y diversos pigmentos de fenazinas.

5.12 Promoción del crecimiento de las plantas de jitomate mediante la aplicación de consorcios microbianos

En la actualidad el desarrollo de bioformulaciones, que son productos biológicamente activos que contienen una o más cepas microbianas benéficas en materiales portadores económicos y fáciles de usar, es una área de investigación en constante expansión, que tiene el objetivo de aumentar la fertilidad del suelo, la promoción del crecimiento en las plantas y la supresión de fitopatógenos por lo que ofrece un enfoque ambientalmente sostenible para aumentar la producción en cultivos [113]. Un primer paso para el desarrollo de dichas bioformulaciones es la investigación en condiciones de invernadero de los posibles beneficios de estas en diferentes plantas.



Figura 64: Crecimiento aéreo de las plantas de jitomate tratadas con los consorcios CS3 y CS4. Se observa un aumento en el crecimiento aéreo de la planta con el tratamiento de CS4.

Se realizó un ensayo para conocer el efecto de los consorcios CS3 y CS4 en la pro-

5.12. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE JITOMATE MEDIANTE LA APLICACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS

La promoción del crecimiento en plantas de jitomate, para ello las plantas fueron inoculadas con uno de los consorcios o con CN (control) una vez a la semana, posteriormente se midió tanto el crecimiento aéreo como la longitud de la raíz. Después de 12 semanas de tratamiento el crecimiento aéreo promedio en cm de las plantas control fue de 26.75, mientras que las plantas tratadas con CS3 fue de 24.92 y el de las plantas inoculadas con CS4 fue 34.76 (Figura 64), por lo que se observó no solo un ligero aumento de tamaño de las plantas que fueron inoculadas con el consorcio CS4, sino además presentaron hojas más grandes.

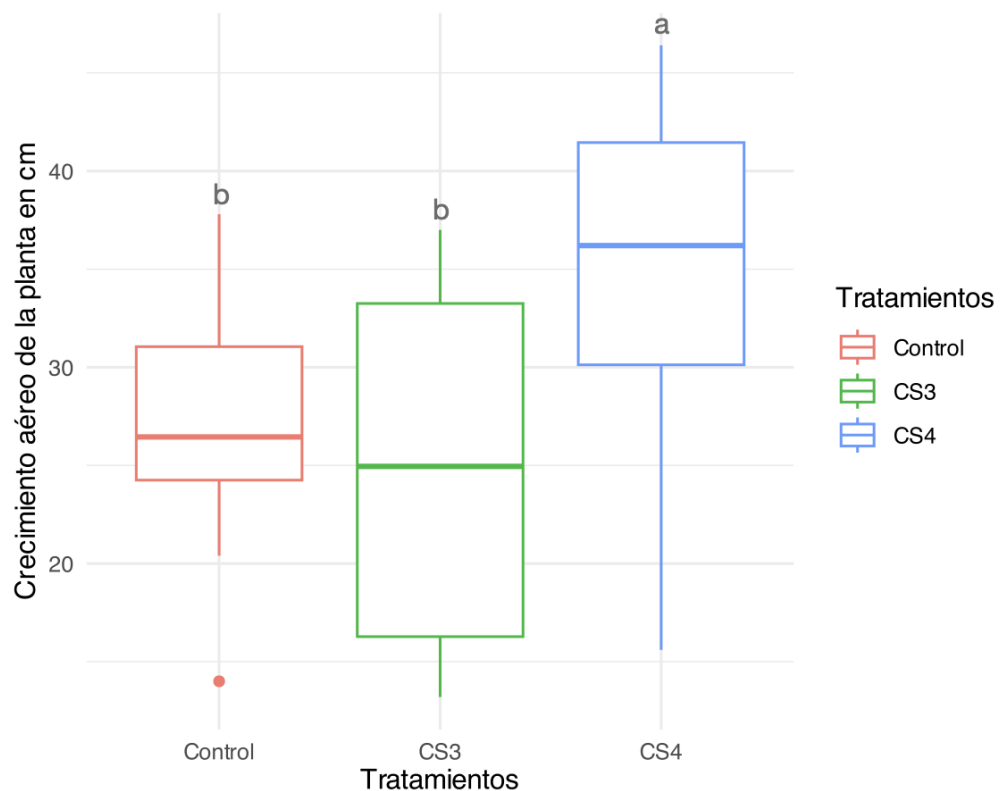


Figura 65: Efecto en el crecimiento de las plantas de jitomate por la aplicación de los consorcios microbianos. Tratamientos con la misma letra no son diferentes significativamente $p < 0,05$.

Al realizar el análisis estadístico de los datos de crecimiento aéreo de las plantas de jitomate tratadas (Figura 65), se encontró que existen diferencias estadísticas significativas (ANOVA, $p = 0,03$) y al realizar la prueba de LSD de Fisher $p < 0,05$ se determinó

que las plantas de jitomate inoculadas con el consorcio CS4 muestran un mayor crecimiento aéreo cuando se comparan con las plantas control. Lo anterior en concordancia con las capacidad promotora del crecimiento que muestran los aislados que constituyen los consorcios, por ejemplo, el aislado de *Klebsiella oxytoca* (1251) es el único capaz de producir AIA y este forma parte del consorcio CS4, esta fitohormona es fundamental para la promoción del crecimiento ya que interviene en la iniciación de la raíz y la división celular, sin embargo el efecto depende de la sensibilidad de la planta y de la cantidad de AIA producido por el microorganismo [43]. En un estudio demostraron que *Pseudomonas* S85 es capaz de mejorar el crecimiento de tomate al producir AIA [57], en ese mismo sentido una cepa de *Pseudomonas fluorescens* B16 mostró una colonización vigorosa de las raíces de tomate, lo que provocó una mejora en el número de flores, la altura de planta y el peso total del fruto [43]. Por otra parte, en una investigación en semillas de maíz encontraron que cepas de *Bacillus*, *Klebsiella oxytoca* y *Pseudomonas nitroreducens* fueron capaces de disolver fosfato con un ISF de entre 2.1 y 4.6 que estimuló la germinación de las semillas [46], cabe destacar que todas las bacterias en CS4 son capaces de solubilizar fosfatos y tienen ISF desde 1.46 hasta 1.6, además de que los microorganismos que producen sideróforos como *Klebsiella* y *Pseudomonas* mejoran la disponibilidad del hierro en las plantas lo que estimula su crecimiento, por lo que la combinación de bacterias capaces de producir AIA, sideróforos y solubilizar fosfatos en los consorcios permitió observar el aumento del crecimiento de las plantas de jitomate.

Para determinar el efecto de los consorcios en las raíces de las plantas de jitomate tratadas, a las 12 semanas después de la siembra se recuperaron suavemente y se lavaron las raíces para su posterior medición (Figura 66), la longitud promedio en cm de las raíces de las plantas inoculadas con CS3 fue de 26.75, mientras que aquellas plantas tratadas con CS4 alcanzaron una longitud promedio de 34.76 en contraste con las raíces de las plantas control que midieron en promedio 26.75 además se observó que la raíz principal de las plantas inoculadas con el consorcio CS4 son un poco más largas al compararlas con las

5.12. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE JITOMATE MEDIANTE LA AIA

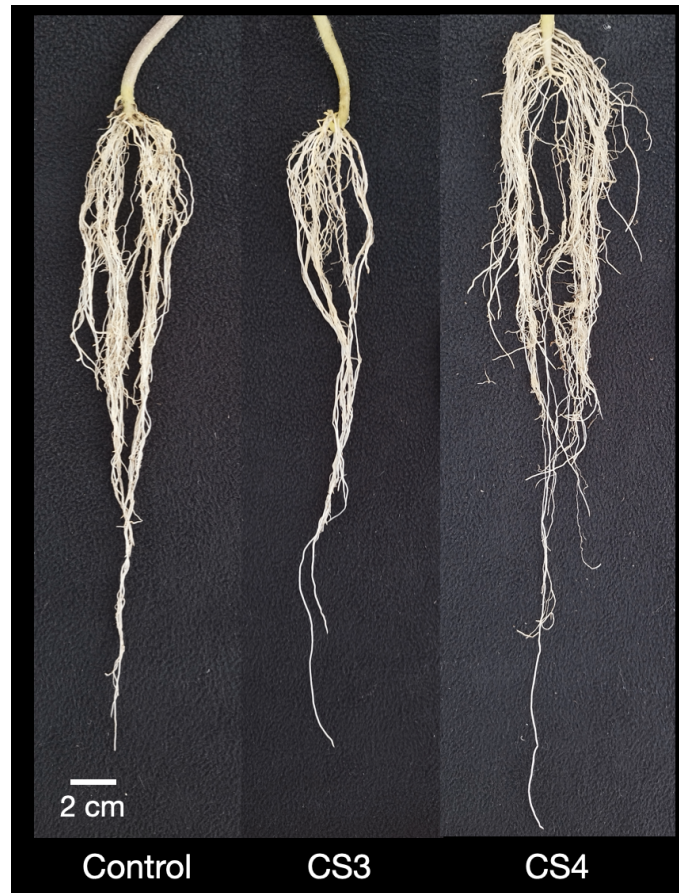


Figura 66: Crecimiento de la raíz de las plantas de jitomate inoculadas con los consorcios.

plantas control, además de un aumento en las raíces secundarias.

Al realizar el análisis estadístico de los datos de crecimiento aéreo de las plantas de jitomate tratadas (Figura 67), se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p = 0,01$) y al ejecutar la prueba de Conover-Iman $p = 0,02$ se encontró las diferencias son al comparar las plantas control con las plantas inoculadas con el consorcio CS4.

El efecto observado puede atribuirse a que los aislados bacterianos que conforman el consorcio CS4 tienen un potencial como PGPR, es conocido que las *Pseudomonas* producen diversas fitohormonas que promueven el crecimiento de las plantas como la ya mencionada AIA, además producen citocinas, hormona que promueve la división celular, el crecimiento de las células y la expansión del tejido en algunas partes de la planta

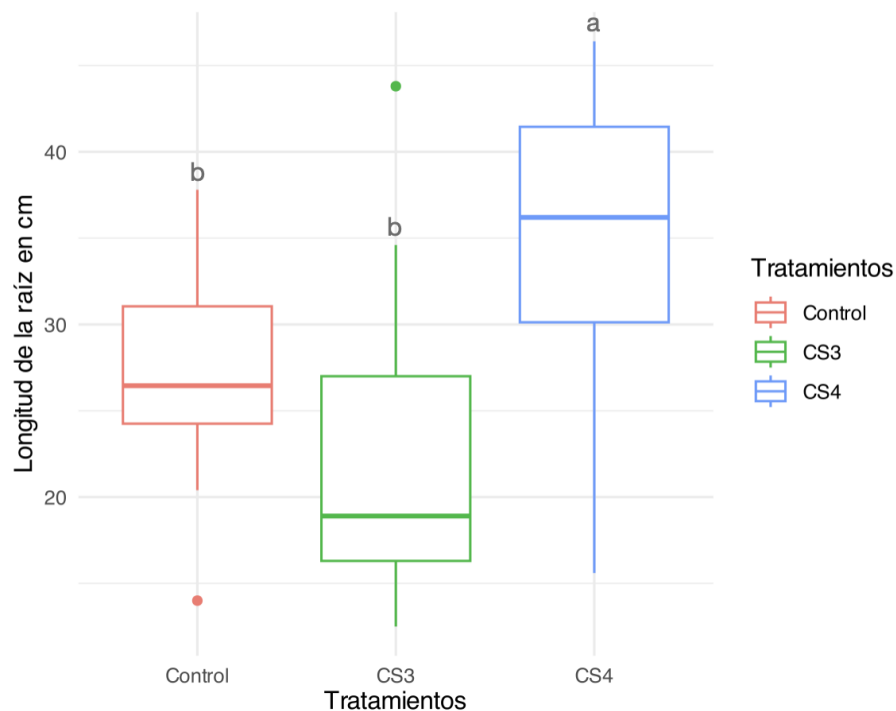


Figura 67: Efecto de los consorcios en el crecimiento de la raíz en el jitomate. Diferencias significativas según la prueba de Conover-Iman a: $p = 0,02$.

[43], también sintetizan 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa) que puede disminuir los niveles de etileno en las plantas [57] y que en el caso de una cepa de *Pseudomonas putida* WPTe productora de ACC desaminasa que redujo la gravedad de la enfermedad de mildiu vellosos además de mejorar el crecimiento y el rendimiento de *Papaver somniferum* y se encontró que el tratamiento con esta cepa de *Pseudomonas* redujo la síntesis del ácido abscísico así como del precursor del etileno y mejoró la producción de AIA en la planta [114]. Asimismo, la cepa de *Variovorax paradoxus* 5C-2 productora de ACC desaminasa inoculada en plantas de guisantes se observó un mayor crecimiento, aumento en la nodulación, en el número de semillas y el contenido de nitrógeno de las mismas, además de mejorar la capacidad de absorción de agua en condiciones de sequía, al igual que la cepa de *P. fluorescens* ACC-5 productora de ACC desaminasa aumentó la longitud de las raíces en *Pisum sativum* [52]. Por otra parte las *Pseudomonas* también producen cofactores como la pirroloquinolina quinona (PQQ) que sintetiza durante su crecimiento (fase estacionaria), es termoestable y soluble en agua,

5.12. PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE JITOMATE MEDIANTE LA AI

este cofactor se ha asociado con la promoción del crecimiento, por ejemplo, en la cepa de *Pseudomonas fluorescens* B16 que promueve el crecimiento en plantas de jitomate al generar un fenotipo mutante en el gen pqq H resultó en la pérdida de la capacidad para promover el crecimiento, se ha sugerido que la PQQ actúa como antioxidante en las plantas; otras bacterias entre ellas *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* tienen la capacidad de solubilizar fosfatos mediante la producción ácido glucónico y PQQ, por lo que se han propuesto como potenciales candidatas para su uso como biofertilizantes fosfatados para plantas de maíz y cacahuete [115].

5.13 Bioprotección en planta de jitomate contra *S. rolfsii* por medio de la aplicación de consorcios microbianos

Para determinar el efecto de los consorcios CS3 y CS4 en el biocontrol de ambos aislados de *S. rolfsii* AHE y HAA se llevó a cabo el ensayo de bioprotección en planta de jitomate. Las semillas fueron colocadas en 5 mL de CN durante 3 h a 150 rpm y 28 °C, las semillas se sembraron en charolas de germinación con suelo estéril, una vez a la semana fueron inoculadas con 1 mL de uno de los tratamientos: CS3 o CS4 y el control con CN (Figura 68). Seis semanas después de la siembra las plántulas de jitomate se trasladaron en vaso de plástico con suelo estéril e inoculadas con 5 mL de los tratamientos una vez a la semana (sección 4.9).

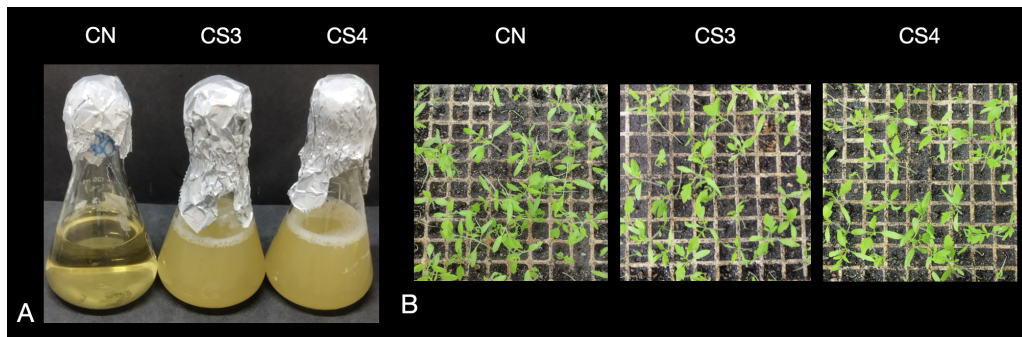


Figura 68: Charolas de germinación con las plántulas de jitomate y los tratamientos. A.- Tratamientos, una vez a la semana las plántulas fueron inoculadas con 1 mL de uno de los tratamientos. B.- Charolas de germinación con cada tratamiento a las seis semanas.

Seis semanas después del trasplante, a las 12 semanas de edad, las plantas de jitomate fueron infectadas con el micelio de uno de los aislados de *S. rolfsii* (Figura 69, A), la infección se realizó colocando micelio cerca de la raíz en la base de la planta (Figura 69, B), una vez a la semana fueron inoculadas con los consorcios o CN según correspondía.

5.13. BIOPROTECCIÓN EN PLANTA DE JITOMATE CONTRA *S. ROLFSII* POR MEDIO DE LA

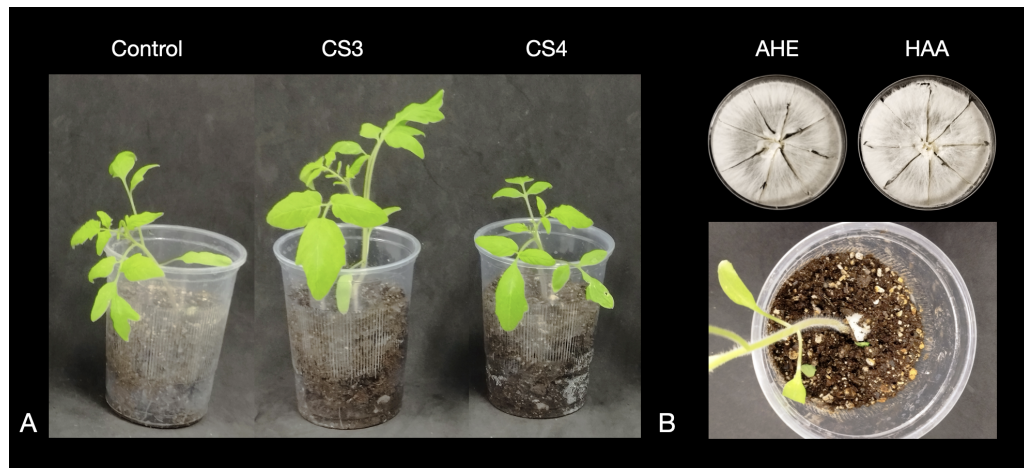


Figura 69: Plantas de jitomate el día de la infección con uno de los aislados de *S. rolfsii*. A.- Las plantas de jitomate el día de la infección. B.- Arriba cajas de Petri con PDA donde crece el micelio del hongo sobre papel celofán, abajo infección de la planta de jitomate con micelio de uno de los aislados del hongo.

Cinco días después de la infección con el aislado de *S. rolfsii* AHE de las 10 plántulas de jitomate que fueron inoculadas con CS3 seis plantas mostraron síntomas de ahogamiento, característico del Tizón sureño, mientras que solo cinco plantas tratadas con CS4 mostraron los síntomas de la enfermedad, en comparación con el control donde en nueve de las 10 plantas se observaron síntomas cinco días después de la infección (Figura 70), por lo que hubo una disminución de la presencia de enfermedad en aquellas plantas tratadas con los consorcios, lo anterior se debe a la capacidad de los aislados bacterianos que conforman los consorcios para producir diversos metabolitos con actividad antifúngica como enzimas líticas, pigmentos de fenazinas, sideróforos, compuestos volátiles, entre otros.

En el caso de las plantas infectadas con el aislado del hongo HAA, cinco días posteriores a la infección de las 10 plantas tratadas con CS3 cinco de ellas mostraron síntomas de Tizón sureño, mientras que para las plantas tratadas con CS4 solo dos presentaron síntomas en contraste con el control donde nueve de las 10 plantas presentaron síntomas de la enfermedad provocada por *S. rolfsii* (Figura 71). Un dato por resaltar es que las plantas

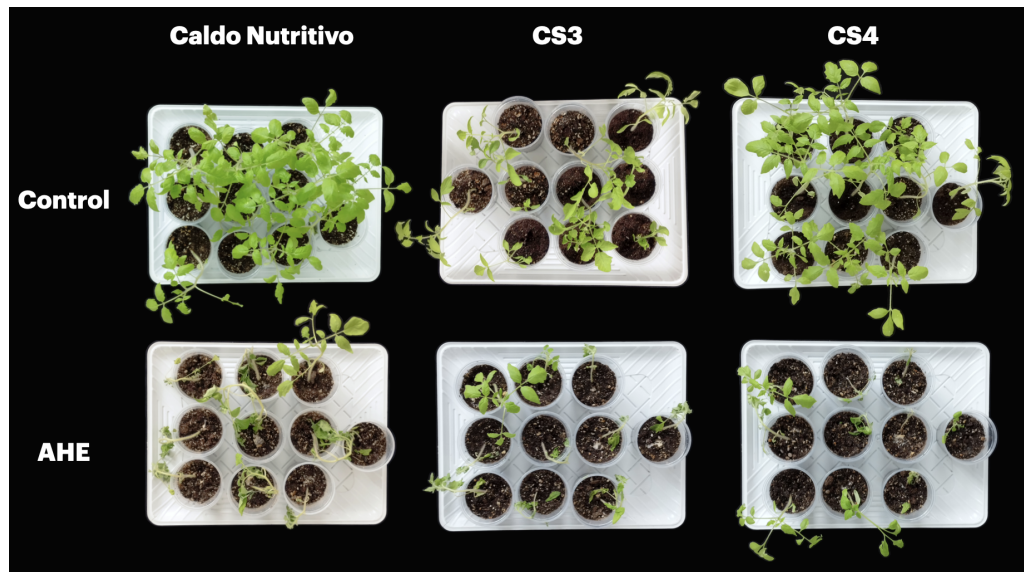


Figura 70: Ensayo de biocontrol contra el aislado de *S. rolfsii* AHE. Comparación de las plantas infectadas con micelio del aislado AHE contra los controles no infectados, cinco días después de la infección.

inoculadas con el consorcio CS4 resistieron el ataque del hongo patógeno. Por otra parte, en uno de los experimentos de biocontrol en planta de jitomate debido a las condiciones de temperatura y humedad del lugar en donde se encontraban las plantas se obtuvieron grupos dispares, ya que, las plantas inoculadas con Caldo Nutritivo no sobrevivieron todas y los grupos quedaron dispares o no balanceados.

Se determinó la incidencia de la enfermedad (IE) a los 30 días después de la infección con uno de los aislados del hongo (fórmula 4.7), también se calculó el índice de severidad (IS) (Tabla 1) y la eficacia relativa de biocontrol (fórmula 4.9), en el caso de las plantas de tomate infectadas con el aislado de *S. rolfsii* AHE se observó que la eficacia relativa de biocontrol fue mayor con el consorcio CS4 con 23.1 %, mientras que la eficacia de biocontrol del consorcio CS3 en el aislado del hongo AHE fue de solo 5.54 %, sin embargo la incidencia de la enfermedad fue menor en las plantas inoculadas con los consorcios (Tabla 27).

Se realizó el análisis estadístico de los datos sobre la incidencia de la enfermedad,

5.13. BIOPROTECCIÓN EN PLANTA DE JITOMATE CONTRA *S. ROLFSII* POR MEDIO DE LA



Figura 71: Ensayo de biocontrol contra el aislado de *S. rolfsii* HAA. Comparación de las plantas infectadas con micelio del aislado HAA contra los controles no infectados, cinco días después de la infección.

(Figura 72) se encontró que existen diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p = 0,03$) y al ejecutar la prueba de Duncan, $p = 0,009$, las diferencias se encuentran entre la incidencia de la enfermedad en las plantas tratadas con el consorcio CS4 comparadas con las plantas control, es decir que CS4 inhibió el crecimiento del aislado de *S. rolfsii* AHE en la planta de jitomate en condiciones de invernadero.

En cuanto al análisis estadístico respecto al índice de severidad de la enfermedad de Tizón sureño provocado por el aislado de *S. rolfsii* AHE en las plantas de jitomate tratadas con los consorcios CS3 y CS4 (Figura 73). Se descubrió que existen diferencias estadísticas significativas (ANOVA, $p = 0,05$) y éstas se encuentran al comparar el índice de severidad del control con la de las plantas tratadas con el consorcio CS4 según la prueba de Tukey $p = 0,04$, por lo que, el consorcio CS4 demostró disminuir la incidencia y severidad del Tizón sureño causado por el aislado AHE de *S. rolfsii* en plantas de jitomate en condiciones de invernadero con una eficacia de biocontrol de 23.1 %.

Se determinó la incidencia de la enfermedad, el índice de severidad y la eficacia re-

Tabla 27: Eficacia relativa de biocontrol en *S. rolf sii* AHE

Tratamiento	Incidencia de enfermedad %	Índice de severidad	Eficacia de biocontrol %
Control	100	94.12	-
CS3	90.91	88.91	5.54
CS4	80.95	72.38	23.1

Los valores corresponden al promedio de dos réplicas biológicas. La eficacia de biocontrol se determinó mediante la fórmula: $\% = (\text{Índice de enfermedad del control} - \text{Índice de enfermedad del antagonista}) / \text{Índice de enfermedad del control}$.

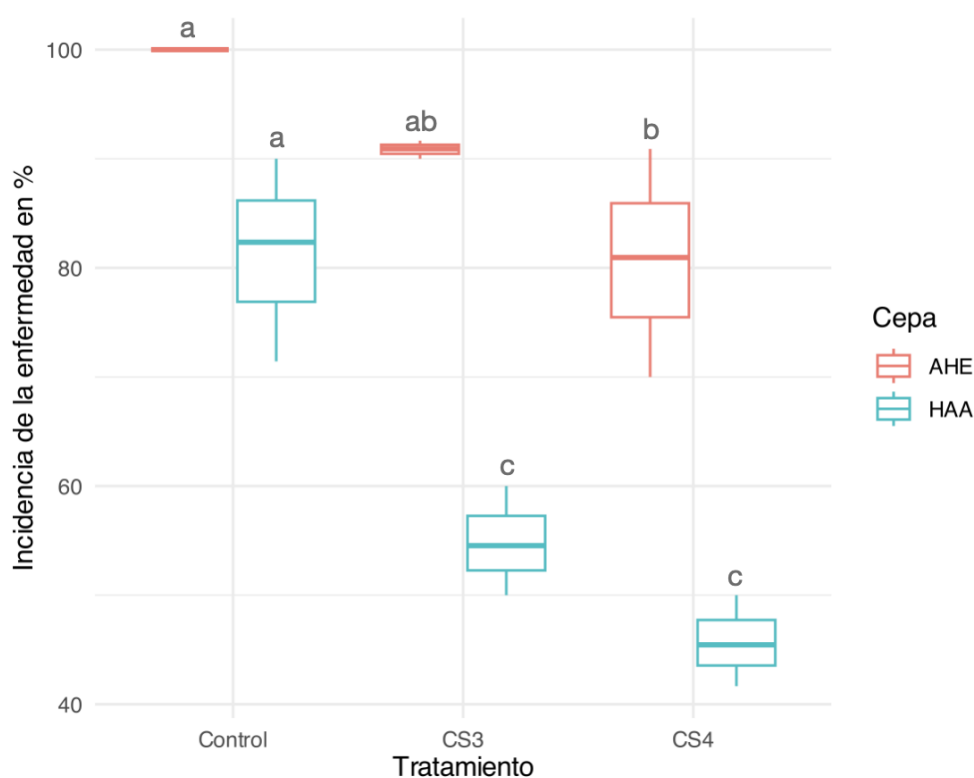


Figura 72: Incidencia de Tizón sureño por ambas cepas de *S. rolf sii* en plantas de jitomate tratadas con los consorcios. Tratamientos con la misma letra no son diferentes significativamente, diferencias estadísticas significativas según la prueba de Duncan b: $p < 0,01$, prueba Tukey c: $p < 0,05$.

lativa de biocontrol de las plantas infectadas con el aislado de *S. rolf sii* (Tabla 28). En este caso se observó que las plantas inoculadas con los consorcios CS3 y CS4 tanto la

5.13. BIOPROTECCIÓN EN PLANTA DE JITOMATE CONTRA *S. ROLFSII* POR MEDIO DE LA

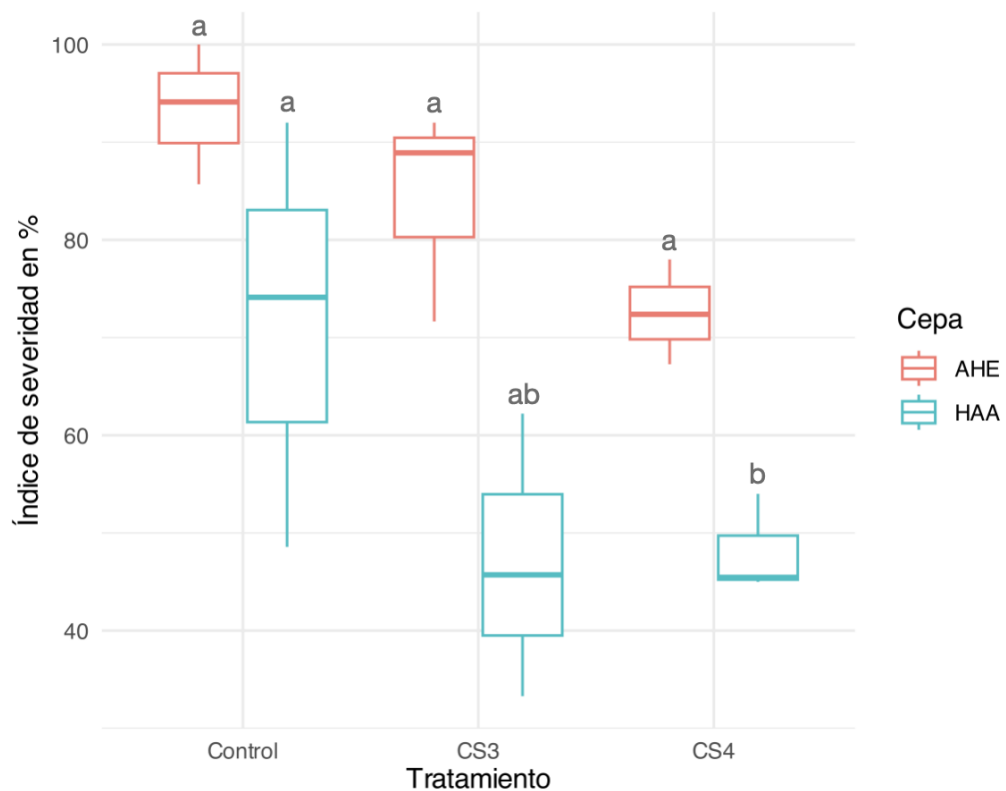


Figura 73: Severidad del Tizón sureño por ambas cepas de *S. rolfsii* en plantas de jitomate tratadas con los consorcios. Tratamientos con la misma letra no son diferentes significativamente, diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey b: $p = 0,04$.

incidencia de la enfermedad como el índice de severidad disminuyeron respecto de las plantas inoculadas sólo con Caldo Nutritivo. La eficacia relativa de biocontrol mayor en este aislado del hongo, fue de 38.33 % con CS3 y para CS4 fue de 33.76 %.

Se analizaron estadísticamente los datos obtenidos acerca de la incidencia de la enfermedad en las plantas infectadas con el aislado de *S. rolfsii* HAA en plantas de jitomate que cada semana fueron inoculadas ya sea con uno de los consorcios o con CN como control (Figura 72), se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA $p = 0,001$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de Tukey se determinó que éstas diferencias se encuentran entre las plantas control y las plantas tratadas con los consorcios CS3 $p = 0,006$ y CS4 $p = 0,001$. Por lo que en condiciones de invernadero los consorcios

Tabla 28: Eficacia relativa de biocontrol en *S. rolfsii* HAA.

Tratamiento	Incidencia de enfermedad %	Índice de severidad	Eficacia de biocontrol %
Control	82.35	74.12	-
CS3	54.54	45.71	38.33
CS4	45.45	49.1	33.76

Los valores corresponden al promedio de dos réplicas biológicas. La eficacia de biocontrol se determinó mediante la fórmula: $\% = (\text{Índice de enfermedad del control} - \text{Índice de enfermedad del antagonista}) / \text{Índice de enfermedad del control}$.

disminuyeron la incidencia de la enfermedad provocada por el aislado del hongo HAA.

En cuanto a la severidad de la enfermedad al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 73). Por otra parte, la eficacia de biocontrol fue mayor con ambos consorcios en las plantas infectadas con el aislado de *S. rolfsii* HAA en comparación con las plantas infectadas con AHE, para CS3 fue 38.33 % y para el consorcio CS4 fue de 33.76 %.

En un ensayo de control biológico de cultivos de *P. fluorescens* contra *S. rolfsii* en semillas de *Atractylodes lancea* una especie de planta, utilizada con fines medicinales en China, que es susceptible al Tizón sureño, observaron que la incidencia de la enfermedad en las semillas infectadas disminuyó en un 70 % debido a los cultivos de *P. fluorescens* poseen metabolitos con actividad antifúngica [112]. En el caso del CS4 logró reducir la incidencia de la enfermedad causada por el aislado de *S. rolfsii* HAA hasta en un 37 %, mientras que CS3 disminuyó la IE en un 28 % en nuestras condiciones experimentales, que potencialmente se debe a la producción de diversos metabolitos antifúngicos producidos en los consorcios, así como las actividades enzimáticas previamente analizadas. El grupo de las *Pseudomonas* sintetizan una variedad amplia de metabolitos antibióticos como 2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina, pioluteorina, COVs, compuestos de fenazinas y lipopéptidos cíclicos [28], es importante mencionar que otro mecanismo indirecto

5.13. BIOPROTECCIÓN EN PLANTA DE JITOMATE CONTRA *S. ROLFSII* POR MEDIO DE LA

que tienen estas bacterias contra los fitopatógenos es la inducción de resistencia sistémica de la planta en donde los microorganismos colonizan la raíz y preparan a la planta para una rápida reacción cuando se encuentre con el ataque de un patógeno a través del envío de señales químicas que incluyen compuestos con actividad antibiótica como 2,4-diacetilfloroglucinol y surfactina, sideróforos y COVs [75].

Los consorcios microbianos utilizados en esta investigación mostraron disminuir significativamente la incidencia de la enfermedad Tizón sureño causada por ambos aislados del hongo fitopatógeno *S. rolfsii* en plantas de jitomate en condiciones de invernadero, además en el caso del aislado del hongo AHE el consorcio CS4 mostró disminuir la severidad de la enfermedad y tener una eficacia de biocontrol de 23.1 % contra AHE y de 33.76 % contra HAA.

Capítulo 6

Conclusiones

Se determinó por pruebas bioquímicas y moleculares la identidad de las bacterias sujeto de estudio. Tres de los aislados pertenecen a la especie de *Pseudomonas putida* (cepa YM9 MK634690.1), otros tres aislados pertenecen a la especie de *Pseudomonas lini* (cepa MMR2 KU672375.1), dos a *Pseudomonas hunanensis* (cepa P11 MN946623.1), uno a *Pseudomonas mediterranea* (cepa CFBP 5447 NR_028826.1), mientras solo uno de los aislados bacterianos corresponde a *Variovorax paradoxus* (cepa 13-0-1D NR_036930.1) y otro a la especie *Klebsiella oxytoca* (cepa BR37 KC593550.1).

A partir de un análisis factorial mixto se ensamblaron cuatro consorcios (CS) denominados CS1, CS2, CS3 y CS4, los cuales en conjunto albergan la mayor cantidad de características positivas relacionadas con su capacidad de promoción del crecimiento vegetal, así como para antagonizar a *S. rolfsii*.

Los consorcios antagonizaron el crecimiento y la producción de esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii* ya sea por: acción de los metabolitos difusibles al medio de cultivo, por lo que se ha descrito en la literatura entre estos se incluyen metabolitos de origen proteico, carbohidratos, compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno, entre otros, que impactan el proceso de crecimiento, así como la diferenciación celular al impactar la cantidad de esclerocios producidos. En caso del aislado AHE todos los consorcios presen-

taron diferencias significativas en la disminución del crecimiento micelial y la producción de esclerocios, en el aislado HAA, CS1 y CS2 inhibieron el crecimiento de micelio y todos disminuyeron la producción de esclerocios.

Los COVs liberados en el ensayo de barrera, todos los consorcios inhiben tanto el crecimiento de micelio como la producción de esclerocios en el aislado de *S. rolfsii* AHE, mientras que para el aislado HAA solo los consorcios CS1, CS2 y CS4 inhibieron la producción de esclerocios. Uno de los COVs con actividad antifúngica que es determinante para el biocontrol es la producción de HCN, aunque no en todos los consorcios se debe producir por igual por lo que resulta interesante estudiar la naturaleza química de aquellos volátiles producidos en los consorcios que presentan mayor potencial antagónico.

En el cultivo dual sin barrera se determinó el efecto de los metabolitos volátiles y difusibles en el medio de cultivo producidos por los consorcios en el crecimiento de micelio y producción de esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii*, en el caso de AHE se encontró que los consorcios CS1 y CS4 inhibieron el crecimiento micelial, mientras que sólo CS1 inhibió la producción de esclerocios. Para HAA los consorcios CS2 y CS3 inhibieron el crecimiento micelial del hongo y todos los consorcios inhibieron la producción de esclerocios con este método, esto puede atribuirse a la capacidad de producir tanto difusibles como volátiles que les permiten antagonizar a *S. rolfsii*, sin embargo, las diferencias observadas en cuanto a la sensibilidad de alguno de los aislados potencialmente se deben a la dinámica metabólica que se presenta en un determinado consorcio.

Para conocer el efecto de los COVs producidos por los consorcios en la germinación y posterior producción de esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii* se realizó el experimento de cultivo dual en tubo de ensayo, se descubrió que todos los consorcios inhibieron la germinación de los esclerocios en el aislado AHE, mientras que para el aislado del hongo HAA CS2 y CS3 inhibieron la posterior producción de esclerocios en dicho aislado. El estudio de los COVs de origen microbiano y su efecto sobre los procesos celulares es un campo nuevo y poco estudiado de la investigación microbiológica, que revela

nuevos aspectos de la actividad microbiana como los patrones de su interacción con otros microorganismos y con organismos superiores.

Por otra parte, se realizó un experimento para conocer si los metabolitos producidos por los consorcios CS3 y CS4 tienen un efecto en la germinación, crecimiento micelial y producción de esclerocios en ambos aislados del hongo fitopatógeno a través de filtrados libres de células (FLC) y se compararon con el uso del fungicida comercial Captan. Se observó que ambos consorcios tienen un efecto de inhibición del crecimiento de micelio de los dos aislados de *S. rolfsii* AHE y HAA, además inhibieron la producción de esclerocios desde un 100 hasta un 81 %. Los consorcios CS3 y CS4 inhibieron la germinación de los esclerocios en ambos aislados de *S. rolfsii*. Los FLC contienen los metabolitos antifúngicos producidos por los consorcios y resultaron mucho más efectivos contra ambos aislados del hongo fitopatógeno en este tipo de cultivo sumergido.

Los consorcios CS3 y CS4, estimularon el crecimiento aéreo y longitud de raíz en plantas de jitomate, con diferencias significativas, por lo que CS4 tiene el potencial de no solo tratar el tizón sureño sino además promover el crecimiento de las plantas de jitomate.

Dado que *S. rolfsii* es un fitopatógeno que ataca una amplia variedad de cultivos agrícolas entre ellos el jitomate donde puede causar grandes pérdidas, se realizó un ensayo de bioprotección en planta de jitomate para determinar el efecto de los consorcios CS3 y CS4, se descubrió que la eficacia de biocontrol contra el aislado de *S. rolfsii* AHE es de 5.54 % con CS3 y 23.1 % con CS4, el consorcio CS4 disminuyó la incidencia de la enfermedad significativamente. En el caso del aislado HAA la eficacia de biocontrol para CS3 fue de 38.33 % y para CS4 fue de 33.76 %, ambos consorcios disminuyeron significativamente la incidencia del tizón sureño causa por este aislado del hongo por lo que en condiciones de invernadero los consorcios resultaron más efectivos contra el aislado de *S. rolfsii* HAA en planta de jitomate.

Los consorcios microbianos utilizados en esta investigación mostraron disminuir sig-

nificativamente la presencia de la enfermedad Tizón sureño causada por ambos aislados de *S. rolfsii* en plantas de jitomate en condiciones de invernadero, además en el caso del aislado del hongo AHE el consorcio CS4 mostró disminuir la severidad de la enfermedad y tener una eficacia de biocontrol de 23.1 % contra AHE y de 33.76 % contra HAA.

Capítulo 7

Perspectivas

- Identificar las moléculas presentes en los compuestos volátiles que producen los consorcios dada su importancia en la disminución en la producción y germinación de esclerocios en dos aislados de *S. rolfsii*.
- Determinar el efecto biofertilizante de los consorcios en invernadero en plantas de jitomate.
- Identificar los metabolitos que secretan los consorcios en los ensayos de antibiosis para así proponer mecanismos de aislamiento y purificación para su potencial uso como agentes de biocontrol.
- Investigar el efecto de los metabolitos con actividad antifúngica a nivel molecular en los esclerocios de *S. rolfsii* para proponer potenciales mecanismos de acción de los mismos.
- Escalar los cultivos de los consorcios para la producción del biofungicida y bio-protector a base de dichos consorcios contra *S. rolfsii* y probar su efecto en otros hongos fitopatógenos de importancia agrícola.
- Proponer procesos de encapsulación de las bacterias utilizadas en los consorcios para promover su vida de anaquel y su liberación en suelo.

Apéndice A

Secuencias 16S ARNr de los aislados bacterianos

1228

ACCGTCCTCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCAT
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACAT
TCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGA
CTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGC
TTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGT
AAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACC
GGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAG
GGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC
GACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCT
CTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTT
CGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATT
TGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTIONCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTT
AGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGACATCGTTT
ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCG
CACCTCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTT

166 APÉNDICE A. SECUENCIAS 16S ARNR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

CTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTC
TACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCG
GGGCTTTCACATCCAACCTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAG
TAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACA
GAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTC
GCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTT
CTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAATAT
TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTG
TGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCA
TTACCCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGG
CCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTC
CTTTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATTCTTAGGCATTACTCA
CCCGTCCGCCGCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGACTGC
A

1230

GGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCG
GTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGGAT
TACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGAC
TACGATCGTTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCT
GTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATG
ACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTA
GAGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTT
ACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAG
CACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTC
TGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCAC
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCT
TGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTA
AAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTTACGGCGTGGACTA

CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCA
GTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTA
CGCATTTCACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAG
CTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATC
CAACTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAA
CGCTTGCACCCTCTGTATTACGCGGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTG
CTTATTCTGTCCGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTTCGCTTACTGCCCTT
CCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCG
GCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAATATTCGCCACTGCTGC
CTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCC
TCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAAC
TAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCC
TGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTCGAAACGTT
GTCCCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCATTACTCACCCGTCCGCCGCT
GAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGACTGCA

1232

GTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATT
ACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACT
ACGATCGTTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTG
TACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGA
CTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAG
AGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTA
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC
ACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCT
GCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACA
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTTAACCTT
GCGGCCGTAICTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAA

168 APÉNDICE A. SECUENCIAS 16S ARNR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

AATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC
CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAG
TATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTAC
GCATTTACCCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGC
TTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCC
AACTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCCAGTAATTCGGATTAAC
GCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGC
TTATTCTGTCCGTAACGTCAAACAGCAAGGTATTCGCTTACTGCCCTTC
CTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGG
CATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCCTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCT
CTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCACCAACT
AGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCT
GCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTTCGAAACGTTG
TCCCCACTACCAGGCAGATTCCCTAGGCATTACTCACCCGTCCGCCGCTG
AATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGACTGC

1234

GGTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATT
ACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACT
ACGATCGTTTTTGTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTG
TACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGA
CTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAG
AGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTA
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC
ACCTGTCTCAATGCTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATT
GGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACA
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTTAACCTT

GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAA
GAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC
CAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAG
TATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTAC
GCATTTACCCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCATACTCTAGC
TCGTCAGTTTTGAATGCAGTTCCCAGGTTAAGCCCCGGGGCTTTCACATCC
AACTTAACGAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAAC
GCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGC
TTATTCTGTTCGGTAACGTCAAACCATCACGTATTAGGTAATGGCCCTTC
CTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGG
CATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCT
CTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACT
AGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCT
GCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTCCGTTTCCGAGCGTTA
TCCCCACTACCAGGCAGATTCTTAGGCATTACTCACCCGTCCGCGCTC
TCAAGAGGTGCAAGCACCTCTCTACCGCTCGACTGCA

1236

TTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCNATGGTGTGACGGGCGGT
GTGTACAAGGCCCNNGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTGCGGATTA
CTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTA
CGATCGGTTTTGTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGT
ACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGAC
TTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGA
GTGCCACCATAAAYGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTAC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA
CCTGTCTCAATGCTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTG
GATGTCAAGGCCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACAT

170 APÉNDICE A. SECUENCIAS 16S ARNR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTG
CGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAG
AGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGT
ATCAGTCCAGGTGGTTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACG
CATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCATACTCTAGCT
CGTCAGTTTTGAATGCAGTTCCAGGTTAAGCCCGGGGCTTTCACATCCA
ACTTAACGAACCACCTACGCGCGCTTTCAGCCCAGTAATTCCGATTAACG
CTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCT
TATTCTGTCGGTAACGTCAAACCATCACGTATTAGGTAATGGCCCTTCC
TCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGGC
ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCT
CCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCTC
TCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCACCTA
GCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCGAAGGTCCCCTG
CTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTCCGTTTCCGAGCGTTAT
CCCCACTACCAGGCAGATTCTTAGGCATTACTCACCCGTCCGCCGCTCT
CAAGAGGTGCAAGCACCTCTCTACCGCTCGACTGCA

1238

GTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGG
TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTC
TGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACT
GCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTT
GGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAA
GGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTCACCGG
CAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGG
TTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA
CAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCT

GGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCG
AATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTG
AGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAG
CTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTAC
GGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCA
CCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCT
TCCTATATCTACGCATTTACCCGCTACACAGGAAATTCCACCACCCTCTA
CCGTA CTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGG
GCTTTCACATCCA ACTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTA
ATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGC
GTCCGCCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAACAGCAAGGTATTTCGC
TTACTGCCCTTCTCCCACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCT
TCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAATATTC
CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTG
ACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCCTTGGTGAGCCATT
ACCCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCC
CGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCT
TTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCATTA CTACC
CGTCCGCCGCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGACTGCA

1240

AGGACTGATCACCGTGGTACCGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTC
TGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG
AACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTT
CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGG
ATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCA
CGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCAC
CTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCATAACGT
GCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACA

172 APÉNDICE A. SECUENCIAS 16S ARNR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

TCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGCTCC
CGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGT
AAGTTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC
GGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAG
GCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAA
CGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG
TTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTC
GCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTACAC
AGGAAATTCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTCGTCAGTTTTGAATGC
AGTCCCAGGTTAAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAACCACCT
ACGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTAT
TACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACG
TCAAACCATCACGTATTAGGTAATGGGCCTTCCTCCCAACTAAAGTGCT
TTACAATCGAAGACTTCTTCACACACGCGCATGCTGGATCAGCTTCGCCA
TGCAATATCCCCTGCTGCTTCGGTAGAGTCTGACGGTTTTAGTCAGTG
TGACTGATCTTCTCGACAGTACGATGCGTGCCTGGTGACCAATCACGTCA
CAACTAGCTAT

1242

AGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGCACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTG
AGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGATAACGCTCGGAAACGG
ACGCTAATACCGCATACTGCTTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCC
TTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATG
GCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACA
CTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCCATTACCTA
ATACGTGATGGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT

GGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCG
GGCTTAACCTGGGAACTGCATTCAAACCTGACGAGCTAGAGTATGGTAGA
GGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAA
CGCATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAA
TGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAG
ATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCT
TGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
GGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGC
CGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTC
TGCAACTCGACGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATG
TCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
GGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA

1244

TCCTTGCGGTTAAGCTAACTACTTCTGGCAGAACCCGCTCCCATGGTGTG
ACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGAT
CCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGA
TCCGGACTACGACTGGTTTTATGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCA
ACCCTTTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGC
CATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGT
CTCATTAGAGTGCCCAACTGAATGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCT
CGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT
GCAGCACCTGTGTTACGGTTCTCTTTTCGAGCACTAAGCCATCTCTGGCGA

174 APÉNDICE A. SECUENCIAS 16S ARNR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

ATTCCGTACATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTA
AACCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT
CAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCG
TTACTGAGTCAGTGAAGACCCAACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAG
CGTCAGTACAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTTCTCCGCAT
ATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCATCCCCCTCTGCCGTAC
TCCAGCGATGCAGTCACAGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTT
ACAACGTCTTACATCACCGCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCG
ATTAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGC
CGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATTAGCCTTCTTTATTAGAAAAGAC
CGTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCTGC
ACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATGTCCAAAATTCCCCCT
GCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGT
CGTCCTCTCAGACCAGCTACAGATCGAAGGCTTGGTGAGCCTTTACCTCA
CCAACCTACCTAATCTGCCATCGGCCGCTCCATTCGCGCAAGGTCTTGCGA
TCCCCTGCTTTCATCCGTAGATCGTATGCGGTATTAGCACAGCTTTCGCT
GCGTTATCCCCACGATTGGGCACGTTCCGATGTATTACTCACCCGTTTCG
CCACTCGCCGCCAGGATTGCTCCCGCGCTGCCGTTTCTGACTTGCA

1251

TGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCG
GACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTG
GGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
CAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
ATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGA

TGAGGTTAATAACCTNGTCNATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGC
TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGA
AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCGAAACTGGCAGGCTGGAGT
CTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCT
CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCC
GG

1252

CAGTCGAGCGGATGAGTGAGCTTGCTCACGGATTTAGCGGCGGACGGGTG
AGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGATAACGTTTCGAAAGGG
ACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCC
TTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATG
GCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACA
CTGGAAGTGGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTA
ATATCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCG
GGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGA
GGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGTCAACTAGCCGTTGGGGTCTTGAGACTTTAGTGGCGCAGCTAA
CGCATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAA
TGAATTGAC

Referencias

1. Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J., Kannangara, S. D. y Promputtha, I. Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **10**, 604923 (2020).
2. Savary, S. *et al.* The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution* **3**, 430-439 (2019).
3. Moore, D., Robson, G. D. y Trinci, A. P. *21st century guidebook to fungi* (Cambridge University Press, 2011).
4. Ayed, F., Jabnoun-Khiareddine, H., Aydi Ben Abdallah, R. y Daami-Remadi, M. Effect of temperatures and culture media on *Sclerotium rolfsii* mycelial growth, sclerotial formation and germination. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* **9**, 429 (2018).
5. Dwivedi, S. y Prasad, G. Integrated management of *Sclerotium rolfsii*: an overview. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* **3**, 137-146 (2016).
6. Mehdi Khanlou, K. *Use of RNAi to evaluate the role of isoflavones in resistance of red clover to Sclerotinia trifoliorum and Sclerotium rolfsii* Tesis doct. (Ghent University, 2013).
7. Shrestha, U., Dee, M. E., Ownley, B. H. y Butler, D. M. Anaerobic soil disinfestation reduces germination and affects colonization of *Sclerotium rolfsii* sclerotia. *Phytopathology* **108**, 342-351 (2018).

8. Ayed, F., Jabnoun-Khiareddine, H., Abdallah, R. A.-B. y Daami-Remadi, M. Effect of different carbon and nitrogen sources on *Sclerotium rolfsii* Sacc. mycelial growth and sclerotial Development. *International Journal of Phytopathology* **9**, 17-27 (2020).
9. Georgiou, C. D., Patsoukis, N., Papapostolou, I. y Zervoudakis, G. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and comparative Biology* **46**, 691-712 (2006).
10. Yan, L. *et al.* Genome sequencing and comparative genomic analysis of highly and weakly aggressive strains of *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of peanut stem rot. *BMC genomics* **22**, 1-15 (2021).
11. Pérez-Moreno, L., Villalpando-Mendiola, J. J., Castañeda-Cabrera, C. y Ramírez-Malagón, R. Sensibilidad in vitro de *Sclerotium rolfsii* Saccardo, a los fungicidas comúnmente usados para su combate. *Revista mexicana de fitopatología* **27**, 11-17 (2009).
12. Butt, B. Z., Sana, N. y Butt, S. Management of *Sclerotium rolfsii* through Methanolic Leaf Extract of *Alstonia scholaris* (L.) R. Br. and *Azadirachta indica* L. *Journal of Bioresource Management* **3**, 1 (2016).
13. Carmona-Hernandez, S. *et al.* Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy* **9**, 121 (2019).
14. Rajput, R. S. *et al.* Seed biopriming through beneficial rhizobacteria for mitigating soil-borne and seed-borne diseases. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management: Volume 2: Rhizobacteria in Biotic Stress Management*, 201-215 (2019).
15. Figueiredo, M. d. V. B., Seldin, L., de Araujo, F. F. y Mariano, R. d. L. R. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. *Plant growth and health promoting bacteria*, 21-43 (2011).

16. Legein, M. *et al.* Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Frontiers in Microbiology* **11**, 544057 (2020).
17. Jayaprakashvel, M., Chitra, C. y Mathivanan, N. Metabolites of plant growth-promoting rhizobacteria for the management of soilborne pathogenic fungi in crops. *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications*, 293-315 (2019).
18. Pastor, N., Carlier, E., Andrés, J., Rosas, S. B. y Rovera, M. Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. *Journal of Environmental Management* **95**, S332-S337 (2012).
19. Jia, X. *et al.* Design, analysis and application of synthetic microbial consortia. *Synthetic and Systems Biotechnology* **1**, 109-117 (2016).
20. Xu, C. y Yu, H. Insights into constructing a stable and efficient microbial consortium. *Chinese Journal of Chemical Engineering* **30**, 112-120 (2021).
21. Layseca, A., de Estudios, O., Agrarias, P. *et al.* Año Internacional de las Frutas y Verduras 2021: oportunidades para la agricultura chilena (2021).
22. Dixit, R. *et al.* Southern blight disease of tomato control by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase producing *Paenibacillus lentimorbus* B-30488. *Plant signaling & behavior* **11**, e1113363 (2016).
23. Gabriela, C. A. Selección de resistencia a *Sclerotium rolfsii* en material silvestre de *Solanum lycopersicum* Var. cerasiforme (2013).
24. Sandoval-Ceballos, M. G. *et al.* The importance of conserving Mexico's tomato agrobiodiversity to research plant biochemistry under different climates. *Plants, People, Planet* **3**, 703-709 (2021).
25. SIAP. *Panorama Agroalimentario* inf. téc. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2023).

26. Sultana, F. y Hossain, M. M. Assessing the potentials of bacterial antagonists for plant growth promotion, nutrient acquisition, and biological control of southern blight disease in tomato. *PLoS One* **17**, e0267253 (2022).
27. Glick, B. R. *et al. Beneficial plant-bacterial interactions* (Springer, 2015).
28. Kenawy, A. *et al. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and their roles in biocontrol of plant diseases. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable stress management: volume 2: rhizobacteria in biotic stress management*, 1-35 (2019).
29. Sarma, B. K., Yadav, S. K., Singh, S. y Singh, H. B. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry* **87**, 25-33 (2015).
30. Koza, N. A., Adedayo, A. A., Babalola, O. O. y Kappo, A. P. Microorganisms in plant growth and development: Roles in abiotic stress tolerance and secondary metabolites secretion. *Microorganisms* **10**, 1528 (2022).
31. Peng, Y. *et al. Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. Frontiers in Microbiology* **12**, 670135 (2021).
32. Le, C. N. *Diversity and biological control of Sclerotium rolfsii, causal agent of stem rot of groundnut* (Wageningen University y Research, 2011).
33. Billah, K. M., Hossain, M. B., Prince, M. y Sumon, M. M. Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different host, and its over wintering survival; A mini review. *International Journal of Advances in Agriculture Sciences* **2** (2017).
34. COSUDE, C. a. d. S. *et al. Guía de identificación y manejo integrado de las enfermedades del frijol en América Central* (2008).
35. Agrios, G. N. *Plant pathology* (Elsevier, 2005).
36. Cibrián-Tovar, D. Manual para la identificación y manejo de plagas en plantaciones forestales comerciales. *Comisión Nacional Forestal-Secretaría de Medio Ambiente*

- de Recursos Naturales, México, Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México* (2013).
37. Papapostolou, I. y Georgiou, C. D. Superoxide radical induces sclerotial differentiation in filamentous phytopathogenic fungi: a superoxide dismutase mimetics study. *Microbiology* **156**, 960-966 (2010).
 38. Erental, A., Dickman, M. y Yarden, O. Sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*: awakening molecular analysis of a “Dormant” structure. *Fungal Biology Reviews* **22**, 6-16 (2008).
 39. El-Naggar, N. E.-A. y Saber, W. I. Natural melanin: current trends, and future approaches, with especial reference to microbial source. *Polymers* **14**, 1339 (2022).
 40. Liang, Y., Xiong, W., Steinkellner, S. y Feng, J. Deficiency of the melanin biosynthesis genes SCD1 and THR1 affects sclerotial development and vegetative growth, but not pathogenicity, in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular plant pathology* **19**, 1444-1453 (2018).
 41. Pandey, M. y Mishra, R. *Sclerotium rolfsii*: A Threat to Legume Crops. *Diseases of Pulse Crops and their Management*, 247.
 42. Blancard, D. *Tomato diseases* (Academic Press San Diego, CA, USA: 2012).
 43. Reddy, P. P. *et al.* *Plant growth promoting rhizobacteria for horticultural crop protection* (Springer, 2014).
 44. Seneviratne, G. *et al.* Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial action. *Plant growth and health promoting bacteria*, 81-95 (2011).
 45. Tilocca, B., Cao, A. y Migheli, Q. Scent of a killer: microbial volatilome and its role in the biological control of plant pathogens. *Frontiers in Microbiology* **11**, 41 (2020).

46. Suryadi, Y., Susilowati, D. N. y Fauziah, F. Management of plant diseases by PGPR-mediated induced resistance with special reference to tea and rice crops. *Plant growth promoting Rhizobacteria for sustainable stress management: Volume 2: Rhizobacteria in biotic stress management*, 65-110 (2019).
47. Pandey, P., Aeron, A. y Maheshwari, D. Sustainable approaches for biological control of *fusarium* wilt in pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh). *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, 231-249 (2011).
48. Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. d. C. y Glick, B. R. Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biology* **10**, 475 (2021).
49. Kong, Z. y Glick, B. R. The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. *Advances in microbial physiology* **71**, 97-132 (2017).
50. Manoj, S. R. *et al.* Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of environmental management* **254**, 109779 (2020).
51. Beltrán Pineda, M. E. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* **15**, 101-113 (2014).
52. Mohammadipanah, F. y Zamanzadeh, M. Bacterial mechanisms promoting the tolerance to drought stress in plants. *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: discovery and applications*, 185-224 (2019).
53. Charpe, A. M. Free-living PGPRs in biotic stress management. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management: Volume 2: Rhizobacteria in Biotic Stress Management*, 275-324 (2019).
54. Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. y Babalola, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **33**, 1-16 (2017).

55. Veselova, M., Plyuta, V. y Khmel, I. Volatile compounds of bacterial origin: Structure, biosynthesis, and biological activity. *Microbiology* **88**, 261-274 (2019).
56. Fincheira, P., Quiroz, A., Tortella, G., Diez, M. C. y Rubilar, O. Current advances in plant-microbe communication via volatile organic compounds as an innovative strategy to improve plant growth. *Microbiological Research* **247**, 126726 (2021).
57. Aydi Ben Abdallah, R., Jabnoun-Khiareddine, H. y Daami-Remadi, M. Exploring the beneficial endophytic microorganisms for plant growth promotion and crop protection: elucidation of some bioactive secondary metabolites involved in both effects. *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications*, 319-352 (2019).
58. Quan, C., Wang, X. y Fan, S. Antifungal compounds of plant growth promoting rhizobacteria and its action mode. *Plant growth and health promoting bacteria*, 117-156 (2011).
59. Aguilar-Paredes, A., Valdés, G. y Nuti, M. Ecosystem functions of microbial consortia in sustainable agriculture. *Agronomy* **10**, 1902 (2020).
60. McCarty, N. S. y Ledesma-Amaro, R. Synthetic biology tools to engineer microbial communities for biotechnology. *Trends in biotechnology* **37**, 181-197 (2019).
61. Torres-Lara, A., Cervantes-Chávez, J. A. y R, A.-J. M. *Caracterización fisiológica y actividad antagónica de bacterias aisladas de huerta de fresa con manejo orgánico contra hongos fitopatógenos* Bachelor's Thesis (Universidad Autónoma de Querétaro, 2020).
62. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory* (1989).
63. Johnson, J. S. *et al.* Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications* **10**, 5029 (2019).
64. Maddison, W. P. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.81. <http://mesquiteproject.org> (2023).

65. Stecher, G., Tamura, K. y Kumar, S. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) for macOS. *Molecular biology and evolution* **37**, 1237-1239 (2020).
66. Rambaut, A. *FigTree* 2018. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
67. Aeron, A., Dubey, R. C. y Maheshwari, D. K. Next-generation biofertilizers and novel biostimulants: documentation and validation of mechanism of endophytic plant growth-promoting rhizobacteria in tomato. *Archives of Microbiology* **203**, 3715-3726 (2021).
68. Tariq, M. R. *et al.* Phosphate solubilizing microorganisms isolated from medicinal plants improve growth of mint. *PeerJ* **10**, e13782 (2022).
69. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* R Foundation for Statistical Computing (Vienna, Austria, 2024). <https://www.R-project.org/>.
70. MacWilliams, M. P. Indole test protocol. *American Society for Microbiology, Washington, DC* (2012).
71. Leber, A. L. *Clinical microbiology procedures handbook* (John Wiley & Sons, 2020).
72. Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. A. y Krieg, N. R. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. *Methods for general and molecular microbiology*, 330-393 (2007).
73. Senthilkumar, M. *et al.* *Isolation of mineral phosphate solubilizing microbes from rhizosphere soil* 2021.
74. Jain, A., Jain, R., Jain, S. *et al.* *Basic techniques in biochemistry, microbiology and molecular biology* (Springer, 2020).
75. Suryadi, Y. *et al.* Characterization of bacterial isolates producing chitinase and glucanase for biocontrol of plant fungal pathogens. (2014).

76. Garrity, G. *Bergey's manual® of systematic bacteriology: volume 2: the Proteobacteria, part B: the Gammaproteobacteria* (Springer Science & Business Media, 2007).
77. Dela Cruz, T. E. E. y Torres, J. M. O. Gelatin hydrolysis test protocol. *Am Soc Microbiol* (2012).
78. Hudzicki, J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology* **15**, 1-23 (2009).
79. Srinivasan, K. y Mathivanan, N. Plant growth promoting microbial consortia mediated classical biocontrol of sunflower necrosis virus disease. *Journal of Biopesticides* **4**, 65 (2011).
80. Wong, C. K. F., Zulperi, D., Saidi, N. B. y Vadamalai, G. A consortium of *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma harzianum* for improving growth and induced biochemical changes in *Fusarium* wilt infected bananas. *Tropical Life Sciences Research* **32**, 23 (2021).
81. Rabinal, C. y Bhat, S. Identification of differentially expressed genes in *Trichoderma koningii* IABT1252 during its interaction with *Sclerotium rolfsii*. *Current Microbiology* **77**, 396-404 (2020).
82. Martínez-Álvarez, J. C. *et al.* Inhibitory effect of antagonistic bacteria against *Sclerotium rolfsii*, causal agent of southern blight of common bean. *Revista mexicana de fitopatología* **39**, 207-218 (2021).
83. Naureen, Z., Price, A. H., Hafeez, F. Y. y Roberts, M. R. Identification of rice blast disease-suppressing bacterial strains from the rhizosphere of rice grown in Pakistan. *Crop protection* **28**, 1052-1060 (2009).
84. Schneider, C. A., Rasband, W. S. y Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**, 671-675 (2012).

85. Chen, P.-H., Chen, R.-Y. y Chou, J.-Y. Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology* **46**, 33-46 (2018).
86. Gandhi, V., Taya, R. y Kumar, A. Viability of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* at different depths and durations in soil. *Indian Journal of Agricultural Research* **51**, 601-605 (2017).
87. Chen, L. *et al.* Seed-borne endophytic *Bacillus velezensis* LHSB1 mediate the bio-control of peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of applied microbiology* **128**, 803-813 (2020).
88. Bidima, M. G., Chtaina, N., Ezzahiri, B. y El Guilli, M. Evaluation of the antagonistic potential of bacterial strains isolated from Moroccan soils for the biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *International Journal of Food Science and Agriculture* **5**, 608-616 (2021).
89. Liu, F. *et al.* Characteristics of biological control and mechanisms of *Pseudomonas chlororaphis* zm-1 against peanut stem rot. *BMC microbiology* **22**, 1-13 (2022).
90. Lehman, D. Triple sugar iron agar protocols. *American Society for Microbiology: Washington, DC, USA*, 1-7 (2005).
91. Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Carroll, K. C. *et al.* *Manual of clinical microbiology* 11.^a ed. (ASM Press, 2015).
92. Tille, P. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* 14.^a ed. (Elsevier Health Sciences, 2017).
93. Burr, S. E., Gobeli, S., Kuhnert, P., Goldschmidt-Clermont, E. y Frey, J. *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *piscium* subsp. nov., isolated from freshwater fish. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **60**, 2753-2757 (2010).

94. Delorme, S. *et al.* *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **52**, 513-523 (2002).
95. Gomez-Lama Cabanas, C. *et al.* Indigenous *Pseudomonas* spp. strains from the olive (*Olea europaea* L.) rhizosphere as effective biocontrol agents against *Verticillium dahliae*: From the host roots to the bacterial genomes. *Frontiers in microbiology* **9**, 277 (2018).
96. Trantas, E. *et al.* Diversity among *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* isolated from tomato and pepper showing symptoms of pith necrosis in Greece. *Plant Pathology* **64**, 307-318 (2015).
97. Kuddus, M., Joseph, B. y Ramteke, P. W. Production of laccase from newly isolated *Pseudomonas putida* and its application in bioremediation of synthetic dyes and industrial effluents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2**, 333-338 (2013).
98. Wang, Y. *et al.* Isolation, identification and characterization of phenolic acid-degrading bacteria from soil. *Journal of applied microbiology* **131**, 208-220 (2021).
99. Satola, B., Wübbeler, J. H. y Steinbüchel, A. Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Applied microbiology and biotechnology* **97**, 541-560 (2013).
100. Im, W.-T. *et al.* *Variovorax ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **60**, 1565-1569 (2010).
101. Bosshard, P. *et al.* 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology* **44**, 1359-1366 (2006).
102. Patel, J. B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular diagnosis* **6**, 313-321 (2001).

103. Regueira-Iglesias, A., Balsa-Castro, C., Blanco-Pintos, T. y Tomás, I. Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: From primer selection to advanced data analysis. *Molecular Oral Microbiology* **38**, 347-399 (2023).
104. Girard, L. *et al.* The ever-expanding *Pseudomonas* genus: description of 43 new species and partition of the *Pseudomonas putida* group. *Microorganisms* **9**, 1766 (2021).
105. Gouy, M., Guindon, S. y Gascuel, O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution* **27**, 221-224 (2010).
106. Liang, P. *et al.* *Klebsiella michiganensis*: a nitrogen-fixing endohyphal bacterium from *Ustilago maydis*. *AMB Express* **13**, 146 (2023).
107. Singh, P., Rajput, R. S., Ram, R. M. y Singh, H. A deeper insight into the symbiotic mechanism of *Rhizobium* spp. from the perspective of secondary metabolism. *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications*, 265-291 (2019).
108. Chavent, M., Kuentz, V., Labenne, A., Liquet, B. y Saracco, J. *PCAmixdata: Multivariate Analysis of Mixed Data* R package version 3.1 (2017). <https://CRAN.R-project.org/package=PCAmixdata>.
109. Kassambara, A. *Practical guide to principal component methods in R: PCA, M (CA), FAMD, MFA, HCPC, factoextra* (Sthda, 2017).
110. Abdi, H. y Williams, L. J. Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics* **2**, 433-459 (2010).
111. Hassan, M. N., Afghan, S. y Hafeez, F. Y. Biological control of red rot in sugarcane by native pyoluteorin-producing *Pseudomonas putida* strain NH-50 under field conditions and its potential modes of action. *Pest management science* **67**, 1147-1154 (2011).

112. Zhou, J., Zhao, X. y Dai, C. Antagonistic mechanisms of endophytic *Pseudomonas fluorescens* against *Athelia rolfsii*. *Journal of applied microbiology* **117**, 1144-1158 (2014).
113. Arora, N. K., Khare, E. y Maheshwari, D. K. Plant growth promoting rhizobacteria: constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. *Plant growth and health promoting bacteria*, 97-116 (2011).
114. Sindhu, S. S. y Sharma, R. Amelioration of biotic stress by application of rhizobacteria for agriculture sustainability. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management: Volume 2: Rhizobacteria in Biotic Stress Management*, 111-168 (2019).
115. Carreño-López, R., Alatorre-Cruz, J. y Marín-Cevada, V. Pyrroloquinoline quinone (PQQ): Role in plant-microbe interactions. *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: Discovery and applications*, 169-184 (2019).